



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

**FACOLTÀ DI FARMACIA
ISTITUTO DI ENDOCRINOLOGIA**

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN

**SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE E METABOLICHE
CICLO XIX**

BIO/09-BIO/13-MED/13

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**CARATTERIZZAZIONE DEL SISTEMA ATTIVATORE
DEL PLASMINOGENO NELLA PROGRESSIONE
METASTATICA DEL CANCRO PROSTATICO UMANO**

Dottoranda: Dott. Margherita Piccolella

Matricola nr. R05568

Tutore: Chiar.ma Prof.ssa Marcella Motta

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Flavio Piva

ANNO ACCADEMICO 2005/2006

ai miei genitori Grazia e Luca

Indice

INTRODUZIONE	3
1. La ghiandola prostatica umana	3
2. Caratterizzazione biomolecolare del carcinoma prostatico umano (CaP).....	5
Il recettore per gli Androgeni.....	5
Il recettore per gli Estrogeni	11
Il sistema EGF/EGFR	14
Il sistema IGF/IGFR	17
Il sistema HGF-SF/c-Met.....	19
Il sistema FGF/FGFR.....	21
I recettori per la Somatostatina	24
Il sistema GnRH.....	26
3. Meccanismi coinvolti nella formazione delle metastasi tumorali..	32
L'Angiogenesi.....	34
La degradazione della Matrice Extracellulare	37
Le Metalloproteasi della matrice	38
Il Sistema Attivatore del Plasminogeno.....	39
- uPA.....	41
- PAI-1 e PAI-2	43
- Il recettore per l'uPA (uPAR)	44
SCOPO DELLA RICERCA	51
MATERIALI E METODI	53
RISULTATI	63
DISCUSSIONE	73
FIGURE.....	89
BIBLIOGRAFIA	110

INTRODUZIONE

1. La ghiandola prostatica umana

La prostata è una ghiandola esocrina androgeno-dipendente organizzata in acini ghiandolari e suddivisa in una porzione basale e luminale. Il tessuto prostatico risulta costituito da uno strato epiteliale la cui funzione è quella di sintetizzare e secernere la maggior parte dei componenti il liquido seminale, e da uno stromale in cui sono presenti fibroblasti, cellule muscolari lisce e vasi sanguigni.

Gli androgeni, ormoni sessuali maschili, sono responsabili sia della differenziazione e della maturazione degli organi riproduttivi maschili che dello sviluppo dei caratteri sessuali secondari.

Il testosterone (T), l'androgeno sessuale maschile più rilevante, viene prodotto a livello del testicolo dalle cellule del Leydig e rappresenta circa il 90% degli androgeni totali circolanti mentre il rimanente 10% è sintetizzato dalla corteccia del surrene come diidroepiandrosterone (DHEA), androstenediolo e androstenedione, che vengono successivamente convertiti in testosterone nei tessuti periferici.

La produzione di testosterone è regolata dall'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi del sistema endocrino attraverso la produzione dell'ormone luteinizzante (LH) rilasciato dall'ipofisi anteriore a seguito della secrezione pulsatile dell'ormone ipotalamico Gonadotropin-releasing hormone (GnRH). Lo stesso testosterone controlla l'attività dell'asse attraverso un meccanismo di feedback negativo operato sia a livello dell'ipotalamo che dell'ipofisi.

Il testosterone è presente in circolo nella forma libera solo per il 2% circa, mentre il rimanente è veicolato nel circolo sistemico legato alle proteine plasmatiche come l'albumina ed a proteine carrier specifiche come Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) (Hammond et al., 2003). Essendo una molecola lipofila, il testosterone è in grado di diffondere attraverso il doppio strato fosfolipidico della membrana plasmatica della cellula target, dove viene rapidamente convertito attraverso l'azione catalitica della 5 α -reduttasi (Tipo I e II) a diidrotestosterone (DHT). Sia il DHT che il testosterone possono legare il recettore degli androgeni (AR), normalmente mantenuto inattivo mediante il legame, alla regione HBD (Hormone Binding Domain), di heat-shock proteins. Quando gli androgeni si legano

al proprio recettore, AR subisce una modificazione conformazionale e dimerizza con un'altra molecola di recettore attivato per formare un'unità funzionale che, legandosi al DNA a livello della regione ARE (Androgen Responsive Element), promuove la trascrizione di geni specifici e la conseguente sintesi di fattori che modulano e promuovono la crescita cellulare (Amanatullah et al., 2000).

L'azione degli androgeni sulla prostata è mediata dal testosterone plasmatico libero e dall'androgeno di maggior potenza il diidrotestosterone.

La conversione del T a DHT nel tessuto prostatico è catalizzata dall'enzima 5 α -reduttasi di Tipo II soprattutto a livello della componente stromale (Silver et al., 1994). Successivamente il DHT viene trasportato a livello delle cellule epiteliali. Tra i due compartimenti esiste infatti una profonda relazione che porta ad avere uno sviluppo controllato della ghiandola prostatica. Questo "crosstalk" tra stroma ed epitelio è molto importante per la regolazione della crescita e dello sviluppo della prostata e per la risposta all'azione androgenica. Gli androgeni costituiscono quindi un fattore essenziale per la prostata, in quanto questo organo non può svilupparsi, differenziarsi, mantenere le dimensioni fisiologiche e funzionare in assenza di T e DHT.

Il recettore per gli androgeni è localizzato sia nella porzione epiteliale che in quella stromale e svolge diverse azioni: a livello del tessuto epiteliale l'AR controlla la proliferazione cellulare, induce differenziamento e regola le funzioni metaboliche e secretorie della prostata, mentre a livello stromale, AR regola la produzione di alcuni fattori di crescita come Epidermal Growth Factor (EGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Insuline-like Growth Factor (IGF), Neuropeptide Growth Factor (NGF), Keratinocyte Growth Factor (KGF), che vanno poi ad agire in modo paracrino sullo strato epiteliale regolandone positivamente la proliferazione delle cellule basali e proteggendo dall'apoptosi le cellule secretorie luminali (Shung & Chung, 2002).

Recenti studi suggeriscono l'esistenza di centinaia di geni il cui livello di espressione subisce una variazione significativa in seguito all'esposizione delle cellule prostatiche agli androgeni (De Primo et al., 2002; Nelson et al., 2002; Velasco et al., 2004; Segawa et al., 2002; Waghray et al., 2001; Xu et al., 2001).

Tuttavia solo 13 di questi geni svolgerebbero un ruolo rilevante nelle normali funzioni della prostata in condizioni fisiologiche (Velasco et al., 2004). Uno di questi

geni androgeno responsivi è quello che codifica per il prostate specific antigen (PSA), una proteasi il cui dosaggio viene utilizzato come un importante marker clinico per lo studio dello sviluppo e dell'ipertrofia prostatica benigna (BPH) e della progressione del tumore prostatico (CaP). Oltre ad esso, attraverso questi studi si sono identificati altri geni androgeno-regolati che comprendono: l'enzima regolatore del ciclo cellulare cyclin-dependent kinase (Cdk-8), la subunità catalitica p85 della phosphatidilinositol-3-kinase (PI3K) e RAB4, membro della famiglia dell'oncogene Ras.

2. Caratterizzazione biomolecolare del carcinoma prostatico umano (CaP)

Il recettore per gli Androgeni

La crescita del tumore prostatico è, in fase iniziale, primariamente dipendente dagli androgeni; tali ormoni sono fondamentali anche per lo sviluppo e il mantenimento dell'epitelio prostatico normale non trasformato. Essi circolano legati, in modo reversibile, alla proteina SHBG, ma la frazione considerata biologicamente attiva è rappresentata da una piccola percentuale di ormone libero. Non è stato ancora totalmente chiarito il ruolo di questa proteina nello sviluppo del tumore prostatico ma, rappresentando una riserva di testosterone, elevati livelli di SHBG sono stati associati ad un maggior rischio di tumore (Meikle et al., 1987; Geller & Vik Franson, 1989).

Il tumore prostatico, una volta progredito verso la fase di androgeno-indipendenza, manifesta resistenza alle terapie ormonali convenzionali. Questo è dovuto non tanto ad una perdita di sensibilità agli androgeni, ma ad una deregolazione della via di segnale mediata da questi ormoni (Jenster, 1999).

Inizialmente, si pensava che il fallimento della terapia con anti-androgeni dipendesse da una perdita dell'espressione genica del recettore AR (Quarmby et al., 1990; Tilley et al., 1990). In seguito, è stato, però, dimostrato che AR è espresso nella quasi totalità dei tumori metastatici, compresi quelli che sono progrediti verso la fase di androgeno-indipendenza (Culig et al., 1998). Inoltre, è stato osservato un aumento dell'espressione del gene AR nel 22% delle metastasi di cancro prostatico (Bubendorf et al., 1999) e nel 23-28% dei casi di tumore prostatico primario (Koivisto et al., 1997), in seguito a terapia anti-androgenica. Più della metà delle forme metastatiche androgeno-indipendenti presentano mutazioni nel gene codificante AR (Taplin et al.,

1995). Sono state trovate mutazioni somatiche puntiformi, responsabili di sostituzioni aminoacidiche nell'“Hormone Binding Domain”; queste forme mutate producono recettori androgenici in grado di legarsi indistintamente ad androgeni, estrogeni, progesterone (Taplin et al., 1995; Tilley et al., 1996), a volte anche anti-androgeni, ribaltando gli effetti di una terapia anti-androgeni.

La presenza di un AR mutato può ridurre l'efficacia di una terapia di rimozione degli androgeni e selezionare cloni cellulari tumorali androgeno-indipendenti.

Il tumore prostatico, come gli altri tumori, è caratterizzato da aberrazioni molecolari e genetiche che possono conferire un aumentato stimolo proliferativo e resistenza alla morte cellulare programmata (apoptosi).

L'AR è una fosfoproteina di 110 kDa localizzata a livello citoplasmatico appartenente alla super famiglia dei recettori per gli ormoni steroidei, che operano come fattori di trascrizione (Lamb et al., 2001). L'AR è costituito da un'unica catena polipeptidica dotata di una struttura modulare con domini funzionali autonomi. Nella porzione N-terminale, una regione variabile e meno conservata, è presente il dominio di transattivazione “transcriptional activation function 1 (AF-1)”, dominio bersaglio di eventi di fosforilazione che partecipa all'attivazione ligando-indipendente del recettore e permette l'interazione con i fattori dell'apparato trascrizionale influenzandone quindi l'attività.

La porzione centrale è costituita dal DNA binding domain (DBD), deputato al riconoscimento di sequenze palindromiche specifiche sul DNA responsive agli androgeni (androgen responsive element, ARE). Il DBD presenta una sequenza amminoacidica ricca di residui di cisteina che coordinano due atomi di zinco e che conferiscono al dominio la struttura spaziale (zinc-finger) necessaria per l'inserimento del recettore nel solco maggiore del DNA. All'interno di tale sequenza, inoltre, sono presenti due regioni importanti per la funzione del dominio stesso: il P-Box e il D-Box che permettono rispettivamente il legame al DNA e la dimerizzazione del recettore.

Una porzione definita “hinge region” funge da cerniera tra il DBD e la porzione C-terminale ligand binding domain (LBD)/transcriptional activation function 2 (AF-2) costituita da 12 regioni ad α -elica (H1-H12) ed un β -turn (tra H5-H6) che formano una tasca idrofobica per il legame al ligando specifico ed alle heat shock proteins (Hsp).

L'AR, infatti, nello stato basale non legato, è localizzato nel citoplasma in un complesso con le Hsp e le immunofiline chaperonine come Hsp90, 70, 56 e 23 (Pratt & Toft, 1997), la cui funzione è quella di impedire la corretta conformazione recettoriale e impedirne l'attivazione. A seguito del legame del testosterone o del DHT al LBD del recettore, il complesso AR-Hsp subisce una variazione conformazionale che determina il rilascio delle Hsp, la dimerizzazione del recettore, la liberazione della porzione del DBD e la conseguente traslocazione dell'AR attivato nel nucleo e il legame al DNA a livello del promoter (AREs) dei geni target.

Una volta legato al DNA, l'AR è in grado di reclutare numerose proteine co-regolatorie che svolgono un ruolo nell'attività trascrizionale (Shang et al., 2002), come i co-attivatori appartenenti alla famiglia delle p160 (SRC-1, GRIP1/TIF2 e RAC3/pCIP/ACTR/AIB1/TRAM1), P/CAF, CBP, Tip60 e p300 ad azione istone acetil-trasferasica (HAT). La loro funzione è quella di indurre acetilazione degli istoni rendendo la cromatina accessibile alla trascrizione da parte della polimerasi e i co-attivatori AR-associated (ARA) ARA70, 55 e 54 che interagiscono con il complesso di inizio trascrizione regolando in modo specifico i prodotti della trascrizione genica regolata dagli androgeni (Naar et al., 2001).

In aggiunta alle proprietà trascrizionali, l'AR esercita funzioni non-genomiche per le quali il legame testosterone/DHT-AR porta all'attivazione della via di trasduzione del segnale Ras/extracellular signal-related kinase (ERK) attraverso l'attivazione di chinasi come c-Src (Migliaccio et al., 2000; Kousteni et al., 2001; Kousteni et al., 2003; Unni et al., 2004). L'attivazione della funzione non-genomiche dell'AR sembra essere in relazione con un aumento della proliferazione cellulare e protezione dai meccanismi apoptotici (Castoria et al., 2003).

Sebbene lo specifico tipo cellulare all'interno del compartimento epiteliale prostatico che porta all'insorgenza del tumore prostatico sia ancora oggetto di discussione (Litvinov et al., 2003) ed il meccanismo molecolare genetico implicato nell'iniziazione e nello sviluppo del cancro prostatico non sia descritto con precisione, l'attività dell'AR appare di notevole importanza in tutte le fasi della progressione della patologia tumorale (Litvinov et al., 2003).

Proprio per questo motivo, le attuali terapie per il tumore prostatico allo stadio avanzato prevedono o la somministrazione di agonisti di GnRH o l'orchidectomia (per

rimuovere gli androgeni prodotti dal testicolo) o la somministrazione di antagonisti dell'AR come la bicalutamide, flutamide o ciproterone acetato (CPA). Come già accennato precedentemente, il tumore prostatico, dopo una prima fase di responsività agli androgeni, sviluppa androgeno resistenza, rendendo così le terapie antiandrogeniche inutili ed inefficaci.

Inizialmente, si ipotizzava che la maggior parte dei tumori prostatici resistenti alla terapia fosse da mettere in relazione con la perdita dell'espressione dell'AR. Tale ipotesi era avvalorata dalla scoperta che diverse linee cellulari di tumore prostatico androgeno-indipendente comunemente studiate non esprimevano l'AR e i tumori derivanti dal modello animale di cancro prostatico (Dunning rat) mostrava la perdita dell'espressione dell'AR nella transizione da androgeno dipendenza ad androgeno-indipendenza (Buchanan et al., 2001a).

In seguito, studi più dettagliati sull'espressione dell'AR in varie fasi cliniche del tumore prostatico hanno dimostrato che la maggior parte dei carcinomi prostatici resistenti agli androgeni mantiene degli elevati livelli di espressione proteica del recettore (Buchanan et al., 2001b) e che l'AR riveste notevole importanza funzionale in assenza di livelli fisiologici di ligando (T e DHT).

Il gene regolato dall'AR codificante il PSA, ad esempio, viene espresso nella grande maggioranza dei tumori prostatici androgeno-resistenti.

Si è infatti visto che, in seguito all'impianto sottocute di cellule di CaP androgeno-dipendenti in topi immunodepressi castrati (e quindi privi di androgeni), l'attività trascrizionale del gene del PSA è inizialmente repressa, ma tale inibizione è transiente poiché viene ripristinata in seguito alla progressione di questi tumori alla fase di androgeno-indipendenza (Zhang et al., 2003).

Ulteriori prove dell'attività svolta dall'AR nei tumori androgeno-resistenti sono state ottenute attraverso l'utilizzo della linea cellulare di adenocarcinoma prostatico sia androgeno-dipendenti che androgeno-indipendenti. Il blocco selettivo dell'attività dell'AR in cellule androgeno-dipendenti LNCaP inibisce sia la proliferazione cellulare che l'espressione del PSA (Zegarra-Moro et al., 2002).

Ma lo stesso risultato è raggiunto quando le cellule androgeno-indipendenti LNCaP-C4, selezionate dalla linea androgeno-dipendente LNCaP, vengono trattate con antiandrogeni (Zegarra-Moro et al., 2002).

Queste evidenze sperimentali suggeriscono quindi che anche il cancro prostatico androgeno-resistente sia in qualche maniera sensibile all'azione mediata dall'AR.

Sebbene i tumori prostatici che si ripresentano in seguito a trattamento di ablazione degli androgeni vengano classificati clinicamente come androgeno-indipendenti, ancora non si è stabilito se essi possano o meno crescere *in vivo* in condizioni di completa assenza di androgeni.

Un'ipotesi avanzata è quella che i tumori resistenti richiedano ancora la presenza di androgeni per la loro crescita e sopravvivenza, ma a delle concentrazioni molto più basse. Secondo tale ipotesi l'AR diverrebbe sensibile ai livelli di testosterone o DHT tipici dell'animale castrato o risponderebbe in maniera più consistente agli androgeni prodotti dalla corteccia della ghiandola del surrene. Analisi dei livelli di androgeni presenti nei tessuti di tumore prostatico androgeno resistente hanno dimostrato che le concentrazioni di DHT, DHEA e androstenedione subiscono una riduzione durante la privazione di androgeni, mentre i livelli di testosterone si mantengono simili a quelli rilevati nel tessuto prostatico di un soggetto non trattato affetto da iperplasia prostatica benigna (Mohler et al., 2004).

Un'altra ipotesi proposta è che l'attivazione dell'AR possa avvenire anche in caso di assenza del proprio ligando specifico. Questa teoria si basa su numerosi studi su colture cellulari per le quali sono state riscontrate mutazioni a carico del gene dell'AR e dei suoi co-attivatori a causa delle quali l'AR verrebbe attivato anche da altri steroidi oltre che da antiandrogeni (Grossmann et al., 2001).

Mutazioni localizzate a livello del dominio di transattivazione AF-2 (aa 874-910) conferiscono al recettore simili proprietà di attivazione ligando-aspecifiche (Bentel & Tilley, 1996). Una mutazione di questo tipo, T877A, è stata osservata nella linea cellulare androgeno-dipendente LNCaP come anche in molti tumori resistenti a seguito del trattamento con l'anti-androgeno idrossiflutamide: questa forma mutata dell'AR viene fortemente attivata dagli androgeni prodotti dal surrene, dall'etradiolo e dal progesterone, come anche dagli anti-androgeni idrossiflutamide e CPA (Veldscholte et al., 1990).

Oggi si tende a pensare che entrambe le ipotesi possano coesistere nel CaP: mutazioni nel gene codificante l'AR, alterati livelli di espressione della proteina o dell'AR ligando-indipendente possono associarsi ad una sensibilità a ridotti livelli di

androgeni ed a ligandi non-androgenici con una conseguente amplificazione dell'attivazione della traduzione dell'AR.

L'importanza rivestita dall'azione dell'AR nelle diverse fasi dello sviluppo e della progressione nonché nel trattamento terapeutico del tumore prostatico, ha portato alla necessità di avere modelli cellulari ed animali che permettessero di studiare i meccanismi molecolari di attivazione e di regolazione dell'AR.

Alcuni ricercatori hanno creato una linea tumorale esprimente l'AR a partire da cellule di CaP androgeno-indipendente PC3 (PC3-AR), in cui è stata ripristinata l'androgeno-dipendenza mediante trasfezione con complementary DNA (cDNA) codificante l'intera lunghezza del recettore (Bonaccorsi et al., 2000). Tali cellule presentano una minor aggressività e capacità invasiva rispetto alle cellule controllo trasfettate col solo plasmide vettore, ma il trattamento con analoghi del testosterone induce una paradossale soppressione della crescita cellulare (Bonaccorsi et al. 2000, Shen et al., 2000; Yuan et al., 1993). Ciò sembra essere in contrasto con quanto avviene in condizioni fisiologiche ed anche durante lo sviluppo del CaP, dove invece gli androgeni esercitano un effetto stimolatorio sulla proliferazione cellulare. La linea cellulare PC3-AR sembra quindi non rappresentare un valido modello per lo studio della progressione del CaP.

Recentemente altri autori (Scaccianoce et al., 2003), hanno isolato una linea cellulare di CaP androgeno-indipendente DU145 iperesprimente l'AR.

Le cellule DU145 sono state trasfettate stabilmente col plasmide contenente il gene dell'AR umano e sono state selezionate le colonie cellulari esprimenti l'AR (DU145-AR).

Nelle cellule DU145-AR la localizzazione dell'AR è a livello citoplasmatico in condizioni basali in assenza di androgeni, mentre in seguito al trattamento con T (0,1 μ M per 48h) l'AR attivato trasloca nel nucleo.

Le cellule DU145-AR trattate con T vedono aumentata la proliferazione cellulare, aumentando la crescita di circa il 30% (Scaccianoce et al., 2003) rispetto alle cellule trasfettate con il plasmide controllo, mentre l'androgeno non esercita alcun effetto sulla proliferazione cellulare delle cellule DU145-pcDNA3.

L'androgeno-dipendenza ripristinata nelle cellule DU145-AR viene confermata dal fatto che la trasfezione delle cellule DU145 con l'AR ripristina l'espressione del PSA, assente nelle cellule parentali (Scaccianoce et al., 2003).

Le cellule DU145-AR con la loro ripristinata sensibilità agli androgeni rappresentano quindi un valido modello per lo studio dei meccanismi di attivazione e regolazione dell'AR coinvolti nella progressione del CaP da androgeno-dipendente ad androgeno-indipendente.

Il recettore per gli Estrogeni

L'effetto benefico del trattamento androgenico sul CaP è stato evidenziato all'inizio degli anni '40 quando Nesbit e Plumb (1946) osservarono una sopravvivenza prolungata nel tempo nei pazienti che avevano subito un'orchidectomia o una terapia estrogenica. Si credeva che la risposta alla terapia estrogenica del CaP androgeno-dipendente fosse principalmente legata alla soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisario con conseguente riduzione dei livelli di testosterone. Il DES (diethylstilbestrolo, un composto di sintesi con azione estrogenica) era in grado di controllare il CaP in fase avanzata, ma questa terapia non era utile nella malattia in fase metastatica a causa dei rischi cardiovascolari connessi con tale trattamento (The V.A.C.U.R.G., 1967). L'avvento degli analoghi del GnRH, che ora vengono ampiamente utilizzati per la loro capacità di indurre castrazione chimica, posero essenzialmente fine all'era del trattamento estrogenico del CaP. Nel 1986 De la Monte et al. (1986) riportarono che pazienti trattati con gli estrogeni sembravano sopravvivere più a lungo rispetto ai pazienti che avevano subito la sola castrazione chimica. Nel 1991 Ferro (1991) dimostrò che gli estrogeni potevano esercitare un effetto citotossico diretto sul tumore alla prostata.

Gli estrogeni regolano funzione e crescita della prostata in diversi stadi di sviluppo attraverso meccanismi sia diretti che indiretti. L'azione indiretta più importante svolta dagli estrogeni consiste nell'interferenza con la produzione degli androgeni, attraverso la repressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, con effetti diretti sui testicoli. Tra gli effetti diretti esercitati dagli estrogeni sulla prostata vi sono, ad esempio, quelli prodotti dall'estradiolo grazie all'aromatizzazione locale del testosterone. Gli estrogeni possono anche essere considerati uno dei fattori di rischio

ormonali dello sviluppo dell'iperplasia prostatica benigna e del cancro prostatico (Bosland, 2000; Henderson & Feigelson, 2000; Griffiths, 2000).

L'evidenza di effetti diretti degli estrogeni sulla prostata deriva soprattutto da studi *in vitro* eseguiti su tessuto prostatico normale di ratto e uomo o su cellule di cancro prostatico umano. In tali studi è stato dimostrato come gli estrogeni possano stimolare la sintesi di DNA ed indurre morfologie epiteliali metaplastiche nella prostata umana e di ratto (Nevalainen et al., 1991, 1993). Gli estrogeni possono regolare l'espressione di specifici geni prostatici (Nevalainen et al., 1991; Martikainen et al., 1987). Quando gli estrogeni sono in combinazione con gli androgeni, gli effetti sulla sintesi del DNA e sull'espressione di specifici geni è fortemente sinergistica.

Lo sviluppo della prostata sembra essere particolarmente sensibile all'azione degli estrogeni. I trattamenti, pre- o neonatali, dei roditori con dosi elevate di estrogeni nei primi 5 giorni dopo la nascita, inducono dei marcati cambiamenti nello sviluppo e nella funzionalità della prostata nelle fasi successive della vita di questi animali. Tutto ciò è invariabilmente associato con iperprolattinemia ed ipoandrogenemia, cosa che potrebbe spiegare la maggior parte di tali effetti. L'estrogenizzazione neonatale con estradiolo e DES provoca un'inibizione tempo- e dose-dipendente della crescita e della funzionalità della prostata in topi e ratti (Naslund & Coffey, 1986; Prins, 1992; Prins et al., 1993; Pylkkanen et al., 1991). Oltre all'inibizione della crescita, l'estrogenizzazione neonatale promuove le infiammazioni, l'iperplasia epiteliale e lo sviluppo di lesioni displastiche, che istologicamente assomigliano alle lesioni PIN (Pylkkanen et al., 1991; Prins & Birch, 1997). Inoltre l'espressione di numerosi ed importante geni regolatori della crescita è alterato. Questo include l'up-regolazione del recettore per gli estrogeni ER α e dei protooncogeni responsivi agli estrogeni c-myc e c-fos (Prins & Birch, 1997; Pylkkanen et al., 1993; Salo et al., 1997) e la down-regolazione di AR ed ER β (Prins & Birch, 1995; Prins et al., 1998).

Un trattamento prolungato dei roditori con dosi elevate di androgeni ed estrogeni insieme induce crescita della prostata, metaplasie epiteliali, ipertrofia stromale ed una forte reazione infiammatoria nello stroma (Tisell, 1971; Andersson & Tisell, 1982; Belis et al., 1983; Risbridger et al., 2001). Questi effetti potrebbero essere largamente causati dall'associazione con l'iperprolattinemia (Lane et al., 1997). Comunque, elevati livelli serici di estrogeni e prolattina associati a livelli molto bassi

di testosterone in topi transgenici che iper esprimono l'aromatasi (AROM+) (Li et al., 2001) o in topi ipogonadici trattato con gli estrogeni (hpg) (Bianco et al., 2002) non inducono iperplasia prostatica, enfatizzando la necessità di un'azione combinata di androgeni ed estrogeni in alcune fasi dello sviluppo prostatico. Sembra comunque evidente il ruolo critico svolto dagli estrogeni in combinazione con gli androgeni e possibilmente con la prolattina, nello sviluppo del cancro prostatico.

Gli effetti sulla prostata degli estrogeni sembrano quindi strettamente associati con quelli della prolattina (Härkönen, 2003). Sia la prolattina ipofisaria che quella prodotta, in maniera endogena, dall'epitelio prostatico (Nevalainen et al., 1997) regolano la prostata stimolando la sua attività secretoria, oltre che la sua proliferazione e sopravvivenza (Nevalainen et al., 1991, 1993; Reiter et al., 1999; Ruffion et al., 2003). Nelle cellule epiteliali prostatiche gli estrogeni aumentano i livelli dei recettori per la prolattina (Nevalainen et al., 1996). E' quindi ipotizzabile che la prolattina medi gli effetti degli estrogeni nella prostata non solo a livello sistemico ma anche a livello cellulare con un importante meccanismo di sviluppo, facilitato dagli estrogeni, dei cambiamenti displastici nella prostata (Härkönen, 2003).

La presenza dei recettori per gli estrogeni ER α ed ER β nella prostata (Latil et al., 2001; Ye et al., 2000; Lau et al., 2000) suggerisce che gli estrogeni potrebbero agire direttamente a livello del tessuto prostatico. Nella prostata umana e di roditore ER β è il sottotipo espresso nella maggioranza delle cellule epiteliali così come in alcune cellule stromali. ER α è espresso in forma più limitata ed è tipicamente localizzato solo nelle cellule stromali. ER β è comunemente espresso anche nel cancro prostatico mentre ER α è stato evidenziato solo in alcuni studi (Bonkhoff et al., 1999). Generalmente i livelli di ER α ed ER β nel tessuto normale e nel cancro prostatico sembrano essere molto bassi ad ogni stadio di sviluppo se paragonati, ad esempio, a quelli presenti nel cancro mammario (Linja et al., 2003). Gli studi di Horvath et al. (2001) e Leav et al. (2001) hanno evidenziato una riduzione dell'espressione di ER β durante la carcinogenesi, suggerendo che ER β potrebbe essere importante per il mantenimento del tessuto epiteliale normale, nonostante non sia ancora noto se la riduzione di espressione di ER β sia una causa dello sviluppo della neoplasia. Horvath et al. (2001) hanno ipotizzato che i tumori che mantengono l'espressione di ER β sono associati ad un'elevata possibilità di ripresa della malattia, e Leav et al. (2001)

riportano che ER β è espresso nelle metastasi del CaP cosa che potrebbe indicare che ER β è un marker di un fenotipo altamente maligno.

Le differenze geografiche dei rischi di insorgenza del cancro prostatico suggeriscono che fattori ambientali possono giocare un ruolo importante nella carcinogenesi prostatica. E' stato ipotizzato che i fitoestrogeni presenti nella dieta potrebbero in parte spiegare il perchè di queste differenze. Studi epidemiologici mostrano come il consumo di fitoestrogeni e/o i livelli sierici di fitoestrogeni siano inversamente correlati con il rischio di insorgenza del cancro prostatico (Lee et al., 2003; Ozasa et al., 2004). Studi sperimentali supportano l'idea dei fitoestrogeni come agenti protettivi del CaP: la genisteina (un fitoestrogeno isoflavonoide) sopprime il cancro prostatico indotto chimicamente (Wang et al., 2002) e riduce l'incidenza di adenocarcinomi scarsamente differenziati nei modelli di topi transgenici (Mentor-Marcel, 2001). Oltre a ciò, una dieta ricca di fitoestrogeni isoflavonoidi inibisce o ritarda lo sviluppo di lesioni displastiche indotte dal DES (Mäkelä et al., 1995). Comunque, gli effetti benefici dei fitoestrogeni nella prevenzione e nel trattamento del CaP umano rimangono da dimostrare. Solo un numero limitato di trials clinici sono stati eseguiti, suggerendo un moderato effetto favorevole ma solo in un numero limitato di individui (Jarred et al., 2002; DeVere et al., 2004).

Studi sperimentali suggeriscono che, un'esposizione inappropriata agli estrogeni durante le fasi critiche della differenziazione e dell'organogenesi potrebbero predisporre la prostata a cambiamenti anormali; gli estrogeni potrebbero anche avere un ruolo nella progressione di lesioni premaligne che possono progredire fino all'insorgenza del cancro prostatico. Altri risultati suggeriscono che l'inibizione delle vie di segnale degli estrogeni potrebbero prevenire questo processo, ipotesi che apre nuove possibilità nello studio del meccanismo di regolazione degli estrogeni nella prostata, per un'azione terapeutica e preventiva dello sviluppo e carcinogenesi prostatica.

Il sistema EGF/EGFR

Alla superfamiglia dell'Epidermal Growth Factor (EGF) appartengono anche il TGF β , l'anfiregulina, l'Heparin-Binding EGF-like Growth Factor (HB-EGF), la

betacellulina (BTC), l'epiregulina (EPI), la tomoregulina (TR) e varie forme di heregulina (HRG). I membri di questa famiglia contengono una regione EGF costituita da tre loops (A, B e C). Tutti questi peptidi si legano a omo- o etero-dimeri e svolgono la loro funzione attraverso dei recettori di superficie tirosino chinasi situati sulla membrana cellulare.

L'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), è iperespresso in diversi tumori come il carcinoma alla prostata (Mamoune et al., 2004).

La famiglia EGFR è costituita da quattro membri: l'EGFR (noto anche come ErbB1 o HER1), HER2 (chiamato anche ErbB2 o Neu), HER3 (conosciuto anche come ErbB3) e HER4 (noto come ErbB4). Diversi studi hanno dimostrato che soprattutto mutazioni di EGFR sono associate con la trasformazione oncogenica (Grünwald & Manuel, 2003).

I recettori appartenenti alla famiglia dell'EGFR presentano una struttura molecolare comune che consiste in un dominio extracellulare aminotermine, una regione singola transmembrana di ancoraggio e un dominio intracellulare carbossiterminale con attività tirosino chinasi.

L'associazione dei ligandi con il dominio extracellulare di EGFR attiva il recettore e le sue vie di trasduzione del segnale, che portano all'attivazione o modulazione dei processi cellulari come proliferazione, differenziamento, migrazione e sopravvivenza. I recettori per EGF possono legare ed essere attivati da un gran numero di molecole conosciute come fattori di crescita EGF-simili. La maggior parte di queste molecole, in seguito a processi regolati, vengono tagliate e rilasciate dalla membrana plasmatica e possono svolgere la loro azione sia in modo autocrino che paracrino. Questi ligandi presentano affinità diverse per i diversi recettori di questa famiglia. Per esempio l'EGF, il TGF- β e l'anfiregulina si associano specificamente a EGFR, mentre l'HB-EGF, la betacellulina e la epiregulina legano sia EGFR che HER4.

Tra le molte vie di trasduzione del segnale attivate dalla famiglia EGF, quella delle Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) è una delle più importanti perché regola processi cellulari come la trascrizione di geni e la proliferazione.

Un'altra importante via di trasduzione attivata è la via PI3K/Akt che media la sopravvivenza cellulare. Il reclutamento di Akt dalla membrana plasmatica innesca

una cascata di segnali per la sopravvivenza, che viene mediata dall'aumento dell'espressione dei segnali anti-apoptotici e diminuzione dei segnali pro-apoptotici. L'interazione con i ligandi provoca anche l'internalizzazione del recettore EGFR. Il complesso ligando-recettore dopo internalizzazione può essere degradato o riportato sulla superficie cellulare per trasdurre nuovi segnali.

Analisi condotte su tessuti prelevati da pazienti affetti da cancro, indicano che l'iperespressione e l'attivazione anormale di EGFR sono caratteristiche di molti tumori e sono spesso associate ad un'infausta diagnosi clinica e chemoresistenza (Grünwald & Manuel, 2003). Il segnale del recettore per EGF è in grado di promuovere la progressione tumorale sia attraverso eventi epigenetici come la de-adesione e la riorganizzazione del citoscheletro, sia alterando il profilo trascrizionale delle cellule cancerogene (Mamoune et al., 2004).

I meccanismi che portano ad una mancata regolazione di EGFR e che possono essere responsabili della trasformazione maligna sono numerosi; tra essi è inclusa l'iperespressione del recettore, mutazioni attivanti, alterazioni nel processo di dimerizzazione, attivazione da parte di fattori di crescita autocrini e mancanza di fosfatasi specifiche.

L'iperespressione di EGFR è uno dei meccanismi più frequentemente implicato nello sviluppo e nella progressione del cancro; tale evento si attua senza che avvenga anche l'amplificazione del gene e si associa con l'attivazione autocrina da parte di TGF- β .

Recentemente sono state descritte delle forme varianti di EGFR che contengono mutazioni nel dominio extracellulare; questa variante III di EGFR (EGFRvIII) è predominante nella maggior parte dei tumori e deriva dal riarrangiamento o splicing alternativo dell'mRNA, che porta alla perdita di 801 paia di basi nel dominio extracellulare responsabile del legame col ligando. Tale variante di EGFR risulta così in una glicoproteina di 145 kDa con un'attivazione costitutiva ligando indipendente dell'attività tirosino chinasi del recettore. Questa delezione, assente nei tessuti non trasformati, è stata identificata nel glioblastoma, ma è anche stata riconosciuta in tessuti di tumore mammario, ovarico e prostatico.

Il sistema IGF/IGFR

Dati derivanti sia da studi epidemiologici che da modelli *in vivo* indicano che esiste una stretta correlazione tra la regolazione attuata dal network dell'insulin-like growth factor (IGF) e la carcinogenesi prostatica (Renehan et al., 2004). L'IGF-1 è un agente importante per la carcinogenesi sia *in vivo* che *in vitro*, in quanto esercita la sua azione mitogenica ed anti apoptotica attraverso meccanismi autocrini e paracrini (Li et al., 2003). La bioattività dell'IGF-1 è modulata dalla presenza della IGF-binding proteins (IGFBPs), che regolano la quota dell'IGF-1 libero di potersi legare al recettore IGF-1 (IGF-1R), un tipico recettore di membrana tirosin-chinasico (Stattin et al., 2000).

Numerosi studi hanno evidenziato una correlazione tra i livelli sierici e plasmatici di IGF-1 ed il rischio di cancro prostatico, ed alcuni di questi studi hanno mostrato una diretta e stretta associazione tra IGF-1 ed il rischio di cancro prostatico (Woodson et al., 2003; Oliver et al., 2004). E' stato ipotizzato che l'IGF-1 circolante potrebbe essere specificatamente coinvolto nella patogenesi precoce del cancro prostatico. Un'ipotesi sostiene che i piccoli foci di cellule cancerose rilascerebbero IGF-1 nel circolo sanguigno già 5 anni prima della diagnosi clinica di tumore prostatico (LeRoith, 2003).

Delle 6 IGFBPs attualmente individuate, IGFBP-3 sembra essere la più importante perché circa il 90% di IGFs formano complessi ternari con questa BP. L'IGFBP-3 è in grado di indebolire l'azione di IGF e di inibire la crescita cellulare attraverso il blocco dei IGFs liberi o attraverso meccanismi IGF-indipendenti (LeRoith, 2003). La trascrizione del gene dell'IGFBP-3 può essere indotto da agenti stimolatori dell'apoptosi, come p53, TGF- β , tumor necrosis factor (TNF)- α e 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$, il metabolita ormonale steroideo della vitamina D (LeRoith, 2003).

Numerosi sistemi sperimentali hanno fornito evidenze che la proliferazione delle cellule di cancro prostatico è incrementata dall'attivazione dell'IGF-1R, sia come risposta ad elevati livelli dell'IGF-1 circolante nell'ospite, sia attraverso un'aumentata produzione autocrina di ligandi da parte delle cellule neoplastiche (Pollak et al., 2004). Un recente studio ha rilevato che l'inibizione dell'espressione endogena del gene dell'IGF-1R porta ad un'inibizione della proliferazione cellulare e ad una

riduzione della capacità invasiva *in vitro* delle cellule transfettate PtdCho-3 (Grzmil et al., 2004).

Recentemente è stato dimostrato che IGF-1R regola l'espressione della MMP-2 nelle cellule invasive PtdCho-3 (Grzmil et al., 2004). In particolare, è stata rilevata una correlazione diretta tra l'inibizione dell'espressione del gene dell'IGF-1R e la down-regolazione dell'espressione del gene dell'MMP-2 nelle cellule di cancro prostatico androgeno-indipendenti. Inoltre è stato dimostrato che IGF-1 induce l'espressione del recettore per l'uPA (uPAR), che facilita la motilità e l'invasione delle cellule di cancro prostatico in fase metastatizzante (Li et al., 2003). Questi dati implicano che, oltre alla sua azione di modulazione della crescita, l'asse IGF-IGF-1R può anche influenzare il potenziale metastatico ed invasivo attraverso l'incremento dell'attività collagenolitica e osteoblastica delle cellule neoplastiche (Koutsilieris et al., 2000).

E' stato recentemente dimostrato che IGF-1 causa l'attivazione ligando-indipendente dell'AR (Kollara et al., 2003). Allo stesso modo, l'azione trofica degli androgeni sembra essere mediata dallo stroma attraverso la secrezione di IGF-1 (Orio Jr. et al., 2002). La progressione verso l'androgeno-indipendenza è stata associata all'elevata espressione dell'mRNA di IGF-1, alla riduzione dell'espressione di IGFBP-3 e all'incremento della fosforilazione di IGF-1R (Nickerson et al., 2001). Recenti dati hanno documentato un cross-talk tra l'AR e la via di segnale di IGF-1, cosa che potrebbe portare ad una over-attivazione dell'AR attraverso bassi livelli degli androgeni (Pollak et al., 2004).

Nuove terapie ormonali combinate con gli analoghi della somatostatina, il glucocorticoide desametasone (Dex) e la terapia di ablazione degli androgeni sono in grado di ridurre i livelli sierici di IGF-1 e reintroducono un obiettivo clinico al trattamento del cancro prostatico androgeno-indipendente. Inoltre, recenti ricerche hanno rilevato che l'inibizione di IGF-1R potrebbe avere un'attività antineoplastica significativa grazie all'incremento dei processi apoptotici, rendendo, quindi, IGF-1R un target per la terapia anticancro (Mutaguchi et al., 2003).

Il sistema HGF-SF/c-Met

L'Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), in differenti tessuti, svolge numerose funzioni chiave per la progressione, invasione e metastatizzazione del cancro prostatico. Vari studi hanno dimostrato che le attività dell'HGF/SF e del suo recettore c-Met sono legate alla progressione della malattia in numerose forme tumorali.

Il comportamento biologico e la storia naturale del cancro alla prostata è molto variabile; diversi fattori sono noti svolgere un ruolo nella cascata di eventi che portano alla formazione di metastasi, un processo che coinvolge numerose e complesse interazioni tra il tumore e le cellule ospiti. L'adesione cellulare, la motilità e l'invasione sono componenti chiave nel processo dinamico della metastatizzazione e l'HGF/SF possiede attività in tutti i diversi passaggi (Parr & Jiang, 2001).

L'Hepatocyte growth factor activator (HGFA) è l'attivatore principale dell'HGF/SF nel siero umano (Miyazawa et al., 1996). La Matriptasi, una serino proteasi di degradazione della matrice promuove la conversione del pro-HGF/SF alla sua forma biologica attiva (Lin et al., 1999). Altri fattori incluso l'eparina, il tPA e l'uPA stimolano la conversione dal pro-HGF/SF ma con minor efficacia rispetto all'HGFA (Naldini et al., 1992; Mars et al., 1996). L'HGFA è attivato dalla trombina e questa via di segnale lega HGF/SF con la cascata di coagulazione, un meccanismo fondamentale nei processi di danneggiamento e riparazione dei tessuti. I livelli di mRNA per HGFA aumentano durante la risposta infiammatoria acuta ad un danno, suggerendo che HGFA possa agire da proteina di risposta anche in fase acuta (Okajima et al., 1997).

HGF/SF media i suoi numerosi effetti biologici legandosi ad uno specifico recettore di membrana, c-Met che è stato identificato in numerosi tumori umani tra cui anche il cancro prostatico (Humphrey et al., 1995). L'espressione di c-Met viene indotta da numerosi fattori tra cui HGF/SF, EGF, Il-1, TNF, estrogeni, progesterone e desametasone (Boccaccio et al., 1994; Chen et al., 1994; Moghul et al., 1994). Mutazioni di c-Met sono stati identificati nel carcinoma papillare renale (Fischer et al., 1988) ed è possibile che diverse isoforme di c-Met esistano in differenti tumori.

HGF/SF inibisce l'apoptosi in numerose linee cellulari (Bardelli et al., 1996) ed è un potente fattore angiogenetico (Bussolino et al., 1992). Gli effetti dell'azione

dell'HGF/SF su proliferazione cellulare, migrazione, morfogenesi ed angiogenesi sono essenziali per la crescita e lo sviluppo dei tessuti normali. HGF/SF regola le funzioni cellulari di un'enorme varietà di tessuti tumorali (Jiang et al., 1999) e manifesta numerosi effetti nei tumori al rene, alla vescica ed alla prostata.

HGF/SF regola l'espressione delle integrine e le proteine del citoscheletro (Giancotti & Mainiero, 1994); inoltre ha un ruolo anche nella degradazione della matrice e nell'invasione, attraverso la stimolazione di uPA e tPA (Morimoto et al., 1994), stimola la produzione di collagenasi-1 e stromelisina-1 (Dunsmore et al., 1996). HGF/SF stimola la dissociazione cellula-cellula inibendo l'adesione cellulare, l'azione di caderina (Pasdar et al., 1997) e promuovendo la rottura dei complessi di adesione cellula-cellula (Hiscox & Jiang, 1998).

Le cellule prostatiche stromali secernono HGF/SF mentre quelle epiteliali esprimono il recettore dell'HGF/SF, c-Met (Krill et al., 1997). Nella prostata l'HGF/SF sintetizzato dalle cellule stromali agisce sulle cellule epiteliali, funzionando quindi come un fattore di crescita paracrino. L'espressione dell'HGF/SF nelle cellule di cancro prostatico è indotta dalla deprivazione degli androgeni e c-Met è preferenzialmente up-regolato nelle cellule metastatiche androgeno-indipendenti (Humphrey et al., 1995). Tali osservazioni suggeriscono una possibile relazione tra l'espressione di c-Met e la progressione del carcinoma prostatico. Davies et al. (2000) hanno dimostrato un'espressione differente di c-Met in diverse linee cellulari di carcinoma prostatico; infatti elevati livelli di c-Met sono presenti nelle linee di cancro prostatico con elevato potere invasivo DU145 e PC3, rispetto ai moderati livelli misurati nelle linee cellulari con basso potere invasivo LNCaP, CAHPV10 e PZHPV7.

L'HGF/SF provoca un'ampia gamma di effetti biologici sulle cellule tumorali e gioca un ruolo essenziale nella progressione tumorale. Il recettore c-Met è espresso dalle cellule di carcinoma prostatico ma non da quelle interstiziali; al contrario HGF/SF è espresso dalle cellule interstiziali ed il livello di espressione è maggiore nei tumori ormono-trattati rispetto a quelli non trattati. Quindi l'espressione di HGF/SF potrebbe essere legata allo stato ormonale del tumore prostatico. Inoltre, mentre il tumore prostatico in fase precoce è caratterizzato dalla presenza di c-Met sulla membrana plasmatica, nel tumore in fase avanzata, c-Met è presente soprattutto nella

porzione citoplasmatica suggerendo una internalizzazione o una down-regolazione del recettore (Kurimoto et al., 1998). Sembra perciò evidente che la relazione tra HGF/SF ed il suo recettore venga influenzata dallo stato ormonale e dal grado di differenziazione del cancro prostatico.

HGF/SF è espresso nelle linee di carcinoma prostatico umano androgeno-indipendenti DU145 e PC3 ma non in quelle androgeno-dipendenti LNCaP; inoltre l'HGF/SF aumenta il potenziale invasivo e la motilità cellulare delle cellule DU145 (Nishimura et al., 1998). Gli stessi autori sottolineano che HGF/SF agisce come un para ormone via c-Met, aumentando il potenziale invasivo e metastatico delle cellule DU145. Tali osservazioni suggeriscono che l'attività invasiva delle cellule di carcinoma prostatico DU145 si manifesti attraverso interazioni tumorali e stromali insieme; le stesse osservazioni sono inoltre supportate da ulteriori sperimentazioni secondo cui l'HGF/SF, prodotto dalle cellule stromali prostatiche, agisca come un fattore di crescita paracrina che stimola la crescita delle linee cellulari di carcinoma prostatico androgeno-indipendenti (Nakashiro et al., 2000).

L'HGF/SF è quindi un mediatore della propagazione del cancro prostatico; attraverso il suo recettore c-Met modula la proliferazione, le interazioni cellula-cellula, la migrazione, le adesioni cellula-matrice, l'invasione e l'angiogenesi delle cellule di carcinoma prostatico.

Il sistema FGF/FGFR

La famiglia dei geni umani FGF consiste all'incirca di 23 differenti geni che codificano per i relativi polipeptidi. Gli FGFs sono espressi in tutti i tessuti e giocano un ruolo importante in diversi processi normali e patologici, incluso lo sviluppo, la cicatrizzazione e la trasformazione neoplastica. Alcuni FGFs, come FGF2 possiedono una potente azione angiogenica e sono implicati, come promotori, nell'angiogenesi tumorale. Gli FGFs sono anche responsabili dell'aumento della motilità e dell'invasività di numerose linee cellulari. Gli FGFs hanno un ampio raggio di attività biologiche e svolgono un ruolo importante nella tumorigenesi. Gli FGFs interagiscono con una famiglia di 4 diversi recettori tirosin-chinasici ad alta affinità FGFR-1,-2,-3,-4 (Johnson & Williams 1993). Inoltre, FGFR-1,-2,-3 possono subire uno splicing alternativo (IIIb, IIIc) che danno diverse isoforme dei recettori con un'affinità di

legame drasticamente alterata. Il sistema FGF è sintetizzato anche dalla matrice extra cellulare (ECM) e dalle proteine secrete che aiutano a mobilitare gli FGFs. I proteoglicani eparina ed eparin-solfato facilitano i segnali FGF mediati dai recettori FGF, sebbene vi siano opinioni controverse riguardanti l'esatto modo attraverso cui questo si verifica (Powers et al., 2000). Il legame FGF/FGFR induce l'attivazione dei recettori che, a loro volta, inducono la traduzione del segnale attraverso diverse vie che includono la fosfolipasi C γ (PLC γ) (Burgess et al., 1990) il fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) (Hart et al., 2001) le MAP chinasi (Hadari et al., 2001) ed il segnale trasduttore ed attivatore della trascrizione (STATs) (Deo et al., 2002, Udayakumar et al., 2002). Tutte queste vie di segnale sono up-regolate nel cancro prostatico, in più vi sono forti evidenze che tali vie di segnale siano legate all'iniziazione e progressione del cancro prostatico.

L'FGF1 ha un forte potenziale mitogenico sul cancro prostatico ed è in grado di legarsi ad ogni isoforma e tipo di recettore per FGF (Ornitz et al., 1996). Più dell'80% dei cancri prostatici esprime FGF1 ed un'elevata espressione è correlata all'aumentare della scala Gleason (Dorkin et al., 1999a). I livelli di FGF1 sono anche aumentati nella neoplasia intraepiteliale prostatica (PIN); le linee cellulari di cancro prostatico umano PC3 e LNCaP esprimono FGF1 (Payson et al., 1998).

FGF2 è espresso in molti tumori umani incluso il cancro prostatico; esso è presente a concentrazione più elevate nel tessuto tumorale prostatico rispetto al tessuto normale (Giri et al., 1999a). Kwabi-Addo et al. (2004) hanno evidenziato che il carcinoma prostatico presenta aumentati livelli di interleuchina-8 (IL-8) e che IL-8 induce l'espressione di FGF2 (Giri & Ittmann, 2001); IL-8, secreto dalle cellule tumorali, è quindi il mediatore dell'induzione dell'espressione di FGF2 nelle cellule stromali. Alti livelli di espressione di FGF2 sono presenti nelle cellule di cancro prostatico umano androgeno-indipendenti DU145 e PC3 (Cronauer et al., 1997). Inoltre, è stato dimostrato che pazienti con carcinoma prostatico hanno alti livelli sierici di FGF2 (Cronauer et al., 1997). Perciò sembra che FGF2 sia espresso inizialmente come fattore paracrina dalle cellule stromali nel cancro prostatico organo-confinato, mentre, durante la progressione tumorale, vi è il passaggio ad un'espressione autocrina.

Anche FGF6 è molto espresso nel cancro prostatico e nel PIN di grado elevato (Ropiquet et al., 2000b); esso ha un ruolo particolare nel cancro prostatico poiché agisce come un fattore paracrino secreto dalle cellule basali residue nel PIN e supporta la crescita delle cellule epiteliali luminali displastiche. Nella maggioranza dei cancro prostatici l'FGF6 secreto dalle cellule tumorali, ha un'azione autocrina.

I livelli sierici di FGF7 sono più bassi negli uomini con cancro prostatico rispetto a quelli con BPH (Mehta et al., 2000a).

Circa il 50% dei tumori organo confinati esprime l'FGF8 mentre l'esprimono l'80% dei tumori in fase avanzata. Dorkin et al. (1999b) hanno osservato una stretta correlazione tra l'espressione di FGF8, il grado tumorale e la sopravvivenza del paziente. FGF8 sembra essere l'isoforma maggiormente presente nel carcinoma prostatico ed è espresso nel linee cellulari di tumore prostatico LNCaP, DU145 e PC3 (Tanaka et al., 1998).

FGFR-1 è espresso nei tumori poco o moderatamente differenziati mentre non è stato evidenziato nelle forme tumorali ben differenziate (Giri et al., 1999a).

FGFR-1 IIIc lega sia FGF2 che FGF6, entrambe presenti in maggior concentrazione nei tessuti tumorali prostatici. Di conseguenza si può ipotizzare che FGFR-1 promuove la progressione del CaP. Naimi et al (2002) hanno evidenziato una diminuzione dell'espressione di FGFR-2 IIb e IIIc nei tessuti di CaP.

FGFR-3 è presente nell'epitelio prostatico normale e continua ad essere espresso nei tessuti di CaP nella sua isoforma IIb che lega FGF1 e FGF9 (Kwabi-Addo et al., 2001).

FGFR-4 è espresso nel tessuto prostatico normale, nelle linee cellulari di CaP e nelle linee cellulari prostatiche umane epiteliali immortalizzate PNT1A (Kwabi-Addo et al., 2001).

I proteoglicani eparina ed eparinsolfato esercitano un ruolo critico nelle vie di segnale di FGF ma poco è noto di come queste molecole vengano modulate durante iniziazione e progressione del CaP. Syndecan-1 è un eparin solfato proteoglicano che può potenzialmente modulare l'attività di FGFR-1. Syndecan-1 può interagire sia con le proteine di matrice sia con numerosi fattori di crescita. Perciò una via potenziale in cui le proteasi possono incrementare la progressione tumorale è proprio attraverso il rilascio locale degli FGFs.

Numerose evidenze sperimentali dimostrano che la via di segnale mediata dai recettori per FGF è aumentata nel CaP da diversi meccanismi che includono un aumento dell'espressione dei ligandi e dei loro recettori, un aumento della mobilitazione degli FGFs dalla ECM e la perdita della regolazione negativa della via di segnale degli FGF. Questo aumento di segnale da parte dei recettori per FGF porta all'attivazione di diverse vie di traduzione del segnale che, nel CaP, induce: aumento della proliferazione, resistenza alla morte cellulare, incremento di motilità ed invasività, aumento dell'angiogenesi e dei meccanismi di metastatizzazione processi che insieme portano ad un aumento della progressione e dell'aggressività clinica del CaP.

Gli FGFs svolgono un'azione importante nei meccanismi di cicatrizzazione che sono caratterizzati da proliferazione e migrazione cellulare (Ortega et al., 1998).

Culig et al. (1994) hanno dimostrato che FGF7, IGF-1 ed EGF attivano la trascrizione androgeno-dipendente dell'AR nel CaP. E' ormai noto che numerosi fattori di crescita e citochine possono attivare la trascrizione androgeno-dipendente dell'AR, ma non è chiaro attraverso quale meccanismo accada. Un meccanismo potenziale è quello dell'attivazione di coattivatori dell'AR attraverso la via delle MAPK (Debes et al., 2003; Rowan et al., 2000). Sono necessari ulteriori studi per capire meglio il crosstalk tra le vie di segnale degli FGFR e l'attività dell'AR. Comunque, stabilito che le vie di segnale degli FGFR sono aumentate nel CaP avanzato, è possibile che gli FGFs contribuiscano significativamente all'attività dell'AR nel CaP androgeno-indipendente.

I recettori per la Somatostatina

La somatostatina (SST) è un peptide prodotto a livello ipotalamico che controlla, in maniera inibitoria, la secrezione, da parte della ghiandola pituitaria, di ormoni della crescita. La SST è presente anche in tessuti extra ipotalamici come le cellule neuroendocrine del pancreas e del tratto gastrointestinale. In queste aree la SST manifesta un ruolo endocrino attraverso il controllo autocrino/paracrino del tratto digestivo, con l'inibizione della secrezione di numerosi ormoni inclusi glucagone ed insulina. Il peptide ha numerose funzioni incluse la modulazione immunologica e la neurotrasmissione; è un inibitore endogeno della proliferazione cellulare e

dell'angiogenesi; spesso il target della SST è lo stesso tessuto in cui il peptide viene prodotto. Cellule immunoreattive per la somatostatina sono state evidenziate anche nella ghiandola prostatica umana (Di Sant'Agnese & De Mesy Jensen, 1984).

L'effetto della SST si pensa sia mediato da recettori specifici per la somatostatina (SSTRs). A tutt'oggi, nei tessuti umani, sono stati identificati e clonati cinque diversi sottotipi di recettore (Hejna et al., 2002; Patel et al., 2004). Mentre tutti i 5 sottotipi del recettore mostrano un'affinità simile per la SST, esistono numerose differenze nel legame tra gli analoghi della somatostatina ed i vari tipi di SSTR (Pollak & Schally, 1998; Lamberts & van der Lely, 2002). L'utilizzo clinico della SST ha l'inconveniente dell'estrema brevità della sua emivita nel plasma (circa 2 minuti). Osservazioni cliniche hanno evidenziato come vari analoghi della SST siano più efficaci nel trattamento di numerosi tumori endocrini (Schally 1988; Schally & Nagy, 2003). L'octreotide è l'analogo della SST più utilizzato; mostra un'elevata affinità per il SSTR2 ed una significativa azione anti neoplastica nei tumori che esprimono SSTR2 (Reubi et al., 2000). I SSTRs sono tipicamente over espressi in numerosi tumori di varia origine con una specificità di sotto tipo per ogni tipo istologico (Reubi et al., 2001).

Dizeyi et al. (2002) hanno identificato SSTR1 nelle cellule cancerose e neuroendocrine di CaP, mentre SSTR2 è stato individuato nello stroma. Gli stessi autori hanno anche trovato che i livelli di espressione del mRNA per SSTR2 sono molto bassi nelle linee cellulari di CaP PC3, DU145 e LNCaP (Dizeyi et al., 2002). Hansson et al. (2002) hanno confermato che l'mRNA per SSTR2 è preferenzialmente localizzato nel compartimento stromale, mentre SSTR4 è presente nelle cellule epiteliali prostatiche. Nei tessuti prostatici umani benigni e maligni Reubi et al. (1995) hanno notato che solo l'octotretotide si lega alla porzione stromale del tessuto prostatico ma non alle cellule di CaP, suggerendo un'elevata espressione di SSTR2 solo nelle cellule fibromuscolari (Reubi et al., 1995). Lo stesso gruppo di ricerca ha trovato che il CaP esprime in maniera predominante SSTR1, mentre SSTR2 è espresso nello stroma del tessuto prostatico umano non neoplastico (Reubi, 1995). Halmos et al. (2000) hanno studiato l'espressione dell'mRNA di 22 campioni di CaP umano trovando che l'mRNA per SSTR1 era presente nell'86% dei campioni, quello per SSTR2 nel 14% e quello per SSTR5 nel 64%. Si può quindi affermare che gli

SSTRs sono presenti sia nel tessuto che nelle cellule di CaP, ma SSTR2 non è la forma prevalente. Poiché SSTR2 è presente principalmente nello stroma della prostata, esso potrebbe essere coinvolto nel controllo della proliferazione cellulare tumorale attraverso il crosstalk tra tessuto stromale ed epiteliale

L'azione anti proliferativi degli analoghi della SST è stata dimostrata in vari tumori inclusi quelli alla mammella, alla prostata, al colon ed al pancreas (Smith & Solomon, 1988; Murphy et al., 1987). Dati presenti in letteratura sostengono che gli analoghi della somatostatina agiscono con due diversi meccanismi d'azione: un effetto citotossico diretto mediato dai recettori ed uno indiretto di inibizione del rilascio di vari ormoni peptidici, fattori di crescita o fattori di crescita tumorale quali ad esempio IGF-1 (Lamberts et al., 2002).

Il sistema GnRH

L'ormone GnRH è un decapeptide il cui ruolo principale è quello di controllare le funzioni riproduttive (Sherwood et al., 1993; Shupnik, 1996). Questo neurormone viene sintetizzato nel citoplasma dei neuroni ipotalamici, racchiuso in granuli nell'apparato del Golgi e trasportato, attraverso gli assoni, alle terminazioni nervose, dalle quali viene rilasciato, in modo pulsatile, nei capillari del sistema portale-ipofisario. Una volta raggiunta l'ipofisi anteriore, il GnRH interagisce con specifici recettori (GnRH-r) presenti sulle cellule gonadotrope, stimolando la sintesi e il rilascio delle gonadotropine LH e FSH nella circolazione sistemica (Stojilkovic & Catt, 1995). LH e FSH agiscono nelle gonadi, regolando la gametogenesi e la sintesi degli steroidi (Kalra, 1993).

Nella maggior parte dei vertebrati, ogni singola specie possiede più di un'isoforma di GnRH. Tutti i peptidi GnRH-simili sono formati da 10 amminoacidi e risultano strutturalmente correlati, con almeno il 50% di omologia di sequenza; le differenze tra i vari peptidi riguardano le diverse sequenze amminoacidiche fra le posizioni 5 e 8 (Tabella 1).

Tabella 1: Struttura primaria di alcune isoforme del GnRH

Isoforme	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GnRH-I (mGnRH)	p-Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂
GnRH-II (cGnRH-II)	p-Glu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly-NH ₂
cGnRH-I	p-Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly-NH ₂
rGnRH	p-Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Trp	Pro	Gly-NH ₂
lGnRH-I	p-Glu	His	Trp	Ser	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro	Gly-NH ₂
lGnRH-III	p-Glu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly-NH ₂
sGnRH	p-Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH ₂
cfGnRH	p-Glu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Pro	Pro	Gly-NH ₂
dfGnRH	p-Glu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH ₂

m, mammiferi; c, pollo; r, anfibi; l, lampreda; s, salmone; cf, pesce gatto; df, pesce cane.

Tra le varie isoforme, una in particolare, individuata, per la prima volta, nel cervello di pollo (e, per questo motivo, chiamata GnRH II di pollo) è universalmente presente e altamente conservata dai Pesci ai Mammiferi (King & Millar, 1997; White et al., 1998). In seguito a studi sulla struttura dei geni codificanti il GnRH, si è ipotizzato che questo peptide potesse essere la conseguenza di una duplicazione genica ancestrale. Vista la sua universalità, esso è stato definito, semplicemente, GnRH II; il classico fattore neuroendocrino riproduttivo viene, invece, indicato come GnRH I.

Il GnRH si lega a specifici recettori appartenenti alla famiglia dei recettori a sette domini transmembrana (GPCRs, recettori accoppiati a proteine G eterotrimeriche) presenti sulle cellule gonadotrope. La presenza di una seconda isoforma di GnRH (GnRH II) in tutti i vertebrati ha stimolato la ricerca di una seconda isoforma di recettore (GnRH-r II) che, recentemente, è stata identificata anche nei primati.

GnRH-r I è accoppiato ad una proteina Gq, la cui stimolazione determina l'attivazione di una fosfolipasi C (PLC β 1), con conseguente formazione di secondi messaggeri: DAG (diacilglicerolo) e IP₃ (inositolo-1,4,5-trifosfato). Il DAG attiva la protein chinasi C (PKC), mentre IP₃ è responsabile del rilascio di ioni calcio dai pools intracellulari. Entrambi gli eventi portano all'attivazione di MAP chinasi, che controllano la biosintesi e la secrezione di LH e FSH (Stojilkovic et al., 1994; Kaiser et al., 1997).

Mediante l'impiego di anticorpi contro il dominio EC3, localizzato nel loop extracellulare 3, di GnRH-r II umano, è stato possibile individuare la sua presenza a livello dell'ipofisi e del cervello, non solo dell'uomo, ma anche in vari pesci (*Carassius auratus*, Illing et al., 1999) e in altri mammiferi come la scimmia (*Callithrix jacchus*, Millar et al., 2001 e *Macaca mulatto*, Neill et al., 2001), la pecora e il topo.

Da un punto di vista strutturale, GnRH-r II presenta elevata omologia più per il GnRH-r I che per altri GPCRs, ma l'identità di sequenza con il recettore umano di tipo I è solo del 41%. L'omologia è conservata da sequenze chiave (Troski et al., 2000), come i ponti disolfuro tra il primo e il secondo loop extracellulare e la sequenza amminoacidica coinvolta nel legame del ligando e delle molecole effettrici. Ci sono, tuttavia, importanti differenze strutturali: per esempio, la funzionalità del recettore di tipo I dipende dall'interazione tra Asn⁸⁷ e Asp³¹⁸ nelle regioni transmembrana II e VII; questi residui non sono conservati nel recettore di tipo II, dove è, invece, presente il motivo Asp/Asp, tipico dei recettori di tipo I recentemente clonati degli organismi non-mammiferi (Tensen et al., 1997; Wang et al., 2001). La differenza principale rimane, sicuramente, l'assenza della coda C-terminale nel GnRH-r di tipo I; fino ad oggi, si riteneva che questa struttura fosse presente in tutti i recettori accoppiati a proteine G, come dimostrato in tutti i GPCRs finora identificati. Inoltre, da tempo è noto che la coda C-terminale dei recettori GPCRs controlla il turn-over del recettore, attraverso una rapida desensitizzazione (Millar et al., 2001). Un'altra differenza importante fra i recettori GnRH-r I e GnRH-r II è che la sequenza LSD/EP del loop EC3 nei recettori di tipo I, importante per la selettività nel legame del ligando (Sealfon et al., 1997; Flanagan et al., 1994), è sostituita da una sequenza VPPS, presente anche nei recettori di tipo II di Rettili ed Anfibi (Troskie et al., 1998).

Probabilmente, sono proprio queste differenze nella sequenza che rendono il recettore di tipo II più affine al GnRH II, visto che tutti gli altri siti di legame conosciuti sono conservati (Sealfon et al., 1997).

Per meglio chiarire le specificità di legame dei due recettori GnRH-r I e GnRH-r II, Millar et al. (2001) hanno effettuato studi in cui le cellule COS-7 venivano transfettate con i rispettivi cDNA per il GnRH-r I (umano) e GnRH-r II (di scimmia). Si è, così, potuto verificare che il GnRH II possiede elevata affinità per il recettore di

tipo II (tale affinità risulta essere 40-80 volte maggiore rispetto a quella evidenziata dal GnRH I sullo stesso recettore) e porta alla formazione di IP₃ come secondo messaggero. Nello stesso studio, si è anche potuto stabilire che il GnRH II possiede un'affinità di legame al recettore di tipo I piuttosto modesta.

Da tali evidenze sperimentali è pertanto possibile dedurre che i decapeptidi GnRH I e II hanno maggiore affinità per i recettori I e II, rispettivamente.

Gli studi condotti nelle cellule COS-7 da Millar et al. (2001) hanno, inoltre, permesso, di ottenere informazioni riguardo la trasduzione del segnale. Sia GnRH-r I umano che GnRH-r II di scimmia sono in grado di attivare le tre classi principali di MAP chinasi (ERK, JNK, p38) nelle cellule COS-7. GnRH I è molto più potente di GnRH II nell'attivare ERK2 quando si lega a GnRH-r I, mentre GnRH II è più potente di GnRH I se consideriamo il recettore di tipo II. Inoltre, nelle cellule COS-7 che esprimono GnRH-r II, gli antagonisti hanno un'attività simile a quella degli agonisti; al contrario, se ad essere espresso nelle cellule COS-7 è GnRH-r I, il peptide GnRH I è molto più efficace dell'antagonista nel fosforilare ERK2. Per quanto riguarda la chinasi p38 α , sembra che la sua attivazione sia indotta stimolando il GnRH-r II con GnRH II ma non attivando il recettore di tipo I con GnRH I; inoltre, il tempo necessario per l'attivazione di p38 α è considerevolmente più lungo di quello necessario per l'attivazione di ERK2 da parte dei recettori I e II.

Inoltre sembra che il GnRH-r I manifesti una velocità di internalizzazione e desensitizzazione ridotta, con un numero ridotto di vie di segnalazione attivate rispetto al recettore di tipo II.

L'espressione di mRNA codificante per il GnRH-r è stata osservata in diversi tumori maligni, come quello alla prostata (Limonta et al., 1993; Dondi et al., 1994; Bahk et al., 1998; Halmos et al., 2000), al seno (Kakar et al., 1994; Kottler et al., 1997), all'endometrio (Imai et al., 1994; Chatzaki et al., 1995) ed all'ovario (Irmer et al., 1995; Yin et al., 1998). La sequenza nucleotidica dell'mRNA per GnRH-r in questi tumori sembra essere identica a quella ipofisaria.

Limonta et al. (1999), mediante analisi Western Blotting e l'utilizzo di uno specifico anticorpo monoclonale contro GnRH-r ipofisario umano (Karande et al., 1995), hanno dimostrato la presenza della banda proteica del GnRH-r il cui peso molecolare è identico a quello determinato precedentemente per GnRH-r ipofisario

umano (Karande et al., 1995), in campioni ottenuti da membrane di cellule tumorali prostatiche.

Nonostante queste osservazioni sembrano confermare l'ipotesi che il GnRH-r dei tessuti tumorali corrisponde a quello ipofisario, almeno in termini di sequenza nucleotidica e peso molecolare, risultati divergenti sono stati riportati per quanto riguarda la capacità di legame del GnRH-r tumorale. Limonta et al. (1992) e Dondi et al. (1994) hanno individuato, nelle cellule di tumore prostatico, siti di legame per GnRH con ridotta affinità per gli analoghi di questo neuromone; altri autori, invece, hanno riportato la presenza di due tipi di siti di legame per GnRH, uno a bassa affinità e l'altro ad alta affinità, nei tumori ginecologici (Emons & Schally, 1994; Emons et al., 1996). Infine, nelle cellule del tumore all'endometrio e in quello ovarico, sono stati individuati solo recettori ad alta affinità (Imai et al., 1994; Irmer et al., 1995).

Alcune di queste discrepanze potrebbero essere dovute alle diverse condizioni sperimentali utilizzate nei saggi di binding, oppure a mutazioni puntiformi nel recettore o nella proteina G alla quale il recettore è accoppiato ed ulteriori studi saranno necessari per chiarire questo problema.

La maggior parte dei dati sopra riportati si riferisce a cellule di tumori ormono-dipendenti. Tuttavia, Dondi et al. (1994) hanno osservato l'espressione di GnRH-r anche in cellule di carcinoma prostatico androgeno-indipendente, indicando che questo recettore è ancora presente dopo che il tumore è progredito verso la fase di androgeno-indipendenza, divenendo anche poco responsivo alle terapie tradizionali.

Il GnRH ipotalamico non è in grado di raggiungere i tessuti periferici, perchè è degradato rapidamente a livello ipofisario; la presenza, quindi, di GnRH-r nelle cellule tumorali ha portato ad ipotizzare che siano le cellule tumorali stesse a produrre GnRH, che agirebbe localmente come fattore autocrino/paracrino. In effetti, immunoreattività per il GnRH è stata riscontrata nei tumori al seno (Butzow et al., 1987), alla prostata (Qayum et al., 1990) e ovarico (Ohno et al., 1993).

Queste osservazioni sono state successivamente confermate da diversi studi che dimostrano l'espressione di mRNA per GnRH nel tumore prostatico umano, sia in fase di ormono-dipendenza (Limonta et al., 1993; Irmer et al., 1995; Kottler et al., 1997) che in cellule di cancro prostatico androgeno-indipendenti (Dondi et al., 1994).

L'osservazione che il GnRH e i suoi recettori sono espressi nelle cellule tumorali, suggerisce l'esistenza di un sistema autocrino/paracrino deputato al controllo locale della crescita del tumore. Questa ipotesi è stata confermata da diversi lavori.

È stato dimostrato che gli agonisti del GnRH esercitano un effetto inibitorio dose-dipendente sulla proliferazione delle cellule di cancro prostatico, sia androgeno-dipendenti (Limonta et al., 1992) che androgeno-indipendenti (Dondi et al., 1994). Inoltre, un'attività antiproliferativa degli agonisti del GnRH è stata riportata anche per il tumore al seno (Miller et al., 1985; Keri et al., 1991), all'endometrio (Emons et al., 1996) e per quello ovarico (Emons et al., 2000).

Queste osservazioni sono state, ulteriormente, confermate da studi in vivo, che mostrano come gli agonisti del GnRH possono contrastare significativamente la crescita di cellule tumorali trapiantate in topi nudi (Loop et al., 1995; Dondi et al., 1998).

Il sistema GnRH presente a livello delle cellule tumorali sembra partecipare alla regolazione della crescita tumorale inibendo la proliferazione cellulare.

Per quanto riguarda il pathway di traduzione del segnale nelle cellule tumorali prostatiche, sia androgeno-dipendenti che androgeno-indipendenti, è stato osservato che l'effetto anti-proliferativo degli agonisti del GnRH è annullato dalla tossina della pertosse. Inoltre, gli agonisti del GnRH antagonizzano la ribosilazione, catalizzata dalla tossina della pertosse, di una proteina G_i (inibitoria). In fine, gli analoghi del GnRH contrastano, in modo significativo, l'aumento dei livelli intracellulari di cAMP indotti dalla forskolina (Limonta et al., 1999). Questi dati indicano che il recettore per GnRH a livello del tumore prostatico potrebbe essere accoppiato ad un pathway di trasduzione del segnale G_i -cAMP.

I meccanismi molecolari che seguono l'attivazione di G_i e che portano all'inibizione della proliferazione delle cellule tumorali sono poco conosciuti. Tuttavia, esistono dati secondo i quali gli agonisti del GnRH interferiscono con gli stimoli proliferativi di fattori di crescita come EGF o IGF. Questi farmaci antagonizzano la proliferazione delle cellule tumorali indotta dai fattori di crescita (GFs), riducono la concentrazione dei recettori per i GFs e contrastano alcuni degli eventi intracellulari attivati dai GFs (per esempio, la fosforilazione del recettore a livello di un residuo di Tyr e l'induzione di c-fos) (Emons et al., 1997; Moretti et al.,

1996; Montagnani Marelli et al., 1999). Si pensa che alcuni di questi meccanismi siano mediati dall'attivazione di una fosfotirosina/fosfatasi, responsabile della defosforilazione dei recettori per EGF, con conseguente soppressione dell'attivazione di proteine MAP chinasi e, quindi, della proliferazione cellulare (Emons et al., 1996).

Più recentemente, è stato proposto che la ridotta proliferazione di alcuni tumori, indotta dal GnRH, potrebbe essere conseguenza di un aumento dell'apoptosi. Il sistema Fas-Fas ligando sembra essere correlato all'attivazione di GnRH-r e sembra essere uno dei possibili mediatori dell'apoptosi indotta da GnRH (Imai & Tamaya, 2000). Nel cancro prostatico, tuttavia, non è stato osservato alcun segno di morte cellulare programmata dopo trattamento con gli agonisti del GnRH.

3. Meccanismi coinvolti nella formazione delle metastasi tumorali

La formazione delle metastasi è un processo in cui le cellule tumorali si staccano dal tumore primario e si dirigono, attraverso la circolazione sanguigna, verso un organo bersaglio, dove formano un tumore secondario. Le metastasi, generalmente, non si formano nelle immediate vicinanze del tumore primario, ma vanno a colpire uno specifico organo bersaglio. Sono stati proposti tre diversi meccanismi per spiegare questa selettività. Il primo prevede una crescita selettiva: le cellule migrano in diverse direzioni, ma crescono solo nell'organo che ha fattori di crescita o ambiente extracellulare adatti. Il secondo meccanismo consiste nell'adesione selettiva alla superficie luminale dell'endotelio solo a livello dell'organo bersaglio. Il terzo sembra essere il più importante, ed è caratterizzato da una chemiotassi selettiva che attrae le cellule tumorali circolanti verso l'organo che produce i fattori chemiotattici stessi.

Il processo di metastatizzazione può essere suddiviso in quattro diversi steps: 1) distacco dal tumore primario e invasione dei tessuti circostanti; 2) ingresso e sopravvivenza nel torrente circolatorio; 3) allontanamento dal torrente circolatorio e penetrazione in un organo o tessuto secondario; 4) sopravvivenza e proliferazione nel sito secondario. Da studi clinici e sperimentali, è noto che la metastatizzazione è un processo inefficiente; infatti, se si iniettano delle cellule tumorali nel sistema circolatorio di modelli sperimentali, meno dello 0,1% di queste cellule darà origine a tumori secondari (Welch & Rinker-Schaeffer, 1999; Fidler, 1990). Le ragioni di questa ridotta percentuale sono state attribuite al basso tasso di sopravvivenza delle

cellule nel sistema circolatorio e alla ridotta velocità di extravasazione in corrispondenza del sito secondario (Chambers, 1990).

Il tumore prostatico, nella maggior parte dei casi, tende facilmente a sviluppare metastasi a livello osseo, provocando sia osteolisi che metastasi osteoblastiche. Per quanto riguarda l'osteolisi, può trattarsi di un processo diretto dalle cellule tumorali stesse, che, mediante il rilascio di serino-proteasi, cisteino-proteasi o metalloproteasi, degradano la matrice extracellulare e provocano la lisi delle cellule ospiti, facilitando, così, l'invasività tumorale (processo non mediato da cellule) (Stetler-Stevenson et al., 1993); può trattarsi anche di un meccanismo cellula-mediato, con l'intervento degli osteoclasti, cellule specializzate nella degradazione della matrice mineralizzata dell'osso. Diversi fattori, rilasciati sia dalle cellule tumorali che dalle cellule del sistema immunitario in risposta al tumore, hanno la capacità di stimolare l'attività degli osteoclasti; per esempio, il TGF- α , l'EGF, citochine come IL-1 e IL-6, il TNF- α e le prostaglandine E (Mundy & Yoneda, 1996); inoltre, diversi tipi di tumore producono il PTHRP (peptide correlato all'ormone paratiroideo) (Henderson et al., 1990), che agisce sugli osteoblasti stimolando, indirettamente, l'attività osteoclastica.

Le metastasi osteoblastiche consistono nella formazione di lesioni in seguito a deposizione di nuovo tessuto osseo. Lo studio dei meccanismi molecolari alla base di questo tipo di lesioni ha portato all'identificazione di alcuni fattori di crescita, rilasciati dal tessuto prostatico e responsabili della stimolazione osteoblastica; tra questi fattori, possiamo ricordare il TGF- β (Steiner & Barrack, 1992), l'FGF (Mansson et al., 1989) e alcune proteine morfogeniche ossee (Harris et al., 1994).

Le cellule tumorali che metastatizzano devono essere in grado di attaccarsi ai componenti della matrice extracellulare o ad altre cellule (dello stesso tipo o di tipo diverso); le integrine, recettori transmembrana in grado di legare molecole della matrice extracellulare, hanno un ruolo critico nell'adesione delle cellule tumorali alla matrice stessa (Woodhouse et al., 1997).

L'invasione di cellule tumorali è un processo attivo di traslocazione attraverso le barriere della matrice extracellulare e richiede proteolisi locale, estensione di pseudopodi e migrazione cellulare (Liotta, 1986). La motilità delle cellule tumorali è un'altra componente importante dell'invasione. Alcuni fattori contribuiscono allo sviluppo di metastasi stimolando la motilità; ci sono fattori prodotti dalle stesse cellule

tumorali, tra cui HGF/SF (Gherardi & Stocker, 1991), IGF-II (El-Badry et al., 1990), ATX (Autotaxina) (Stracke et al., 1992), fattori che corrispondono alle proteine della matrice extracellulare (vitronectina, fibronectina, laminina, collagene di tipo I e IV, trombospondina) e fattori di crescita secreti dall'ospite (istamina, IGF-1 e IL-8). Questi fattori di mobilità possono indurre cambiamenti di forma, riarrangiamenti del citoscheletro e cambiamenti nell'adesione cellulare e/o nella fluidità di membrana (Woodhouse et al., 1997).

Infine, la formazione di metastasi necessita la proliferazione del tumore nel sito secondario, stimolata dalla presenza di fattori di crescita.

Inoltre la crescita tumorale richiede un aumento dell'apporto di sangue grazie allo sviluppo di nuovi vasi sanguigni (Folkman, 1992). Le cellule tumorali rilasciano fattori angiogenetici solubili che sono in grado di indurre la neovascolarizzazione (Folkman & Klagsbrun, 1987).

L'Angiogenesi

Le cellule tumorali possono overesprimere i fattori angiogenetici o alterare la regolazione dei fattori angiogenetici endogeni provocando uno squilibrio tra i fattori pro- ed anti-angiogenetici (Liotta et al., 1991). La vascolarizzazione tumorale è differente rispetto a quella presente nel tessuto normale. I recettori del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sono up regolati nei nuovi vasi sanguigni (Feng et al., 2000) e la presenza delle integrine $\alpha V\beta 3$ e $\alpha V\beta 5$ è molto elevata nei tessuti tumorali rispetto a quelli normali (Brooks et al., 1994). Gli endoteli di diversi tessuti sono anche fenotipicamente distinti, variano in risposta a diversi regolatori angiogenetici (Pasqualini & Ruoslahti, 1996), e sono regolati dall'espressione di citochine e fattori di crescita tessuto-specifici del microambiente tumorale (Fidler, 2001). Sia i fattori endogeni che i farmaci somministrati possono regolare l'angiogenesi direttamente o indirettamente. Per esempio, gli inibitori terapeutici dell'angiogenesi possono esercitare un diretto effetto citostatico e citotossico indirettamente, attraverso l'utilizzo di fattori secondari che regolano i processi angiogenetici. Terapie combinate con agenti antiangiogenetici e citotossici hanno evidenziato una certa efficacia nei trials preclinici.

Il VEGF è stato descritto per la prima volta nel 1983 (Senger et al., 1983). Il gene che codifica per VEGF risiede sul cromosoma 6p21.3 con una regione codificante di circa 14.000 basi. Il gene di VEGF umano contiene otto esoni. Almeno sei isoforme della proteina sono frutto di splicing alternativo dell'RNA messaggero. Tutti i sei mRNAs sono omologhi per gli esoni 1-5 e 8, ma variano per gli esoni 6 e 7. Le isoforme di VEGF vengono rilasciate come omodimeri della superfamiglia delle cisteine e mostrano somiglianza con la famiglia delle Platelet-derived Growth Factor (PDGF) (Muller et al., 1997). Durante l'angiogenesi le cellule endoteliali passano da uno stato inattivo ad una rapida crescita indotta da fattori secreti dalle cellule tumorali stesse (Folkman et al., 1989). In numerose biopsie di tumori umani era presente un'aumentata espressione di mRNA per VEGF e dei recettori per VEGF nelle cellule endoteliali adiacenti. L'annullamento dell'attività di VEGF grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali anti VEGF sopprime completamente l'angiogenesi del CaP e blocca la crescita tumorale nella fase di crescita pre-vascularizzata (Borgstrom et al., 1998). L'espressione di VEGF è mediata da fattori esterni quali ipossia, fattori di crescita e citochine. La regolazione di VEGF può avvenire a livello trascrizionale (Mazure et al., 1996), post-trascrizionale (Levy et al., 1996) e traduzionale (Akiri et al., 1998). Le citochine, i fattori di crescita e le gonadotropine che non stimolano l'angiogenesi direttamente possono modulare l'angiogenesi grazie all'alterazione dell'espressione di VEGF in specifici tipi cellulari oltre ad esercitare effetti anti-angiogenetici diretti ed indiretti (Fidler, 2001). I fattori che possono potenziare la produzione di VEGF includono l'FGF-2 (Seghezzi et al., 1998), l'FGF-4 (Deroanne et al., 1997), il platelet derived growth factor (PDGF) (Finkenzeller et al., 1992), il tumor necrosis factor (TNF) (Giraud et al., 1998), il TGF- β (Pertovaara et al., 1994), l'IGF-1 (Warren et al., 1996), l'interleukin 1 β (IL-1 β) (Li et al., 1995) e IL-6 (Cohen et al., 1996).

Il VEGF può anche stimolare direttamente le cellule di tumore prostatico tramite meccanismi autocrini e/o paracrini dipendenti dal VEGFR-2 (Jackson et al., 2002), e la stimolazione autocrina del VEGF può coincidere con la progressione verso un fenotipo maligno (Soker et al., 2001). Inoltre, la privazione androgenica delle cellule di cancro prostatico androgeno-dipendente LNCaP *in vitro* ha portato ad un

decremento di incidenza del VEGF sia a livello di mRNA, che proteico, almeno in parte dovuto ad una destabilizzazione della trascrizione dell'mRNA.

La trascrizione del VEGF può anche essere regolata dalle interazioni cellula-cellula o cellula-ECM. La via di regolazione che media tali effetti coinvolge fattori quali le focal adhesion kinase (FAK), Src, fosfatidilinositolo 3 kinase (PI3K), Raf e le MAPK chinasi attraverso una via Ras-indipendente (Sheta et al., 2000).

Le cellule di CaP umano in fase metastatica mostrano un'aumentata produzione di VEGF e di vascolarizzazione tumorale rispetto alle cellule di CaP con basso potenziale metastatico (Balbay et al., 1999).

In un recente studio è stata valutata l'espressione di VEGF nelle cellule LNCaP, che non esibiscono un fenotipo metastatico, e di due sue linee cellulari derivate: LNCaP-Pro5 (leggermente metastatiche) e LNCaP-LN3 (estremamente metastatiche) dopo impianto ortotopico in topi nudi atimici. *In vitro*, la produzione di VEGF da parte delle LNCaP-LN3 era significativamente più alta di quella delle cellule LNCaP e LNCaP-Pro5. *In vivo*, i tumori LNCaP-LN3 esibivano livelli più alti di VEGF sia come mRNA che come proteine così come erano maggiori i livelli proteici del recettore VEGFR-2 e la densità di microvascolarizzazione rispetto ai tumori LNCaP o LNCaP-Pro5.

Gli androgeni sono coinvolti nella regolazione del flusso sanguigno *in vivo* nella prostata normale e tumorale dei ratti. La castrazione inibisce l'espressione di VEGF e induce apoptosi nelle cellule endoteliali anticipando l'apoptosi delle cellule tumorali *in vivo* (Jain et al., 1998). Altri studi hanno dimostrato che la castrazione inibisce la produzione tumorale di VEGF, ma non ha effetti su altri fattori angiogenetici (Joseph & Isaacs, 1997).

Le cicloossigenasi sono coinvolte nell'ipossia angiogenetica indotta attraverso le interazioni con il VEGF. Alcune evidenze suggeriscono che l'inibizione di questo fattore potrebbe anche indurre apoptosi nelle cellule di CaP, sebbene le relazioni con l'angiogenesi non siano ben definite (Hsu et al., 2000). Nel cancro, l'espressione stromale di COX-2 è inalterata, ma l'espressione delle cellule tumorali è significativamente più alta. Inoltre l'espressione dei COX-2 è significativamente più alta nei tumori scarsamente differenziati. L'espressione di COX-2 nel cancro sembra

essere maggiore rispetto a quella nell'iperplasia prostatica benigna (Madaan et al., 2000).

L'angiogenesi è un passaggio critico per la proliferazione locale e metastatica del CaP. La terapia antiangiogenetica è, quindi, di particolare interesse per i numerosi target terapeutici, tenendo anche conto di come la regolazione dell'angiogenesi tumorale sia estremamente multifattoriale.

La degradazione della Matrice Extracellulare

L'invasione e la metastasi tumorale sono processi che richiedono sia la formazione che la distruzione delle interazioni cellula-cellula e cellula-ECM, ma anche la degradazione delle componenti di ECM, poiché costituiscono una barriera fisica ai processi di migrazione e invasione.

Le interazioni cellula-cellula e cellula-ECM sono mediate da recettori di adesione cellulare, che interagiscono con specifiche proteine di ECM o con proteine presenti sulla superficie di altre cellule. Queste interazioni possono essere stabili (per esempio, tra cellule epiteliali), oppure transitorie e altamente regolate (come quelle tra i leucociti e l'endotelio vascolare).

Per poter degradare la matrice extracellulare, le cellule esprimono una varietà di proteasi, con diverse attività e specificità di substrato. L'attività di queste proteasi è localizzata e regolata mediante la loro interazione con le componenti di ECM e con una varietà di inibitori specifici e recettori della superficie cellulare.

Lo stroma interstiziale è formato da varie proteine: collagene, proteoglicani, gelatine, laminina e fibronectina e può essere degradato da quattro classi di enzimi proteolitici: cisteino-proteasi, aspartico-proteasi, serino-proteasi e metalloproteasi (Birkedal-Hansen et al., 1993).

Le cisteino-proteasi e le aspartico-proteasi sono delle proteasi endo/lisosomiali appartenenti alla famiglia delle cathepsine; fino ad ora, sono state identificate due aspartico-proteasi e sette cisteino-proteasi; alcune sono espresse in modo ubiquitario, altre hanno un pattern di espressione tipico di alcuni tessuti. È dimostrato che le cathepsine sono coinvolte in numerosi processi, compresi lo sviluppo del tumore e la metastasi (Blasi & Stoppelli, 1998).

Le Metalloproteasi della matrice

Le metalloproteasi della matrice (MMPs) sono enzimi appartenenti ad una famiglia di endopeptidasi neutre, zinco-dipendenti. Da un punto di vista strutturale, questi enzimi presentano un dominio catalitico, contenente il sito di legame, altamente conservato, per lo ione Zn^{2+} ; un peptide segnale; un pro-peptide, essenziale per il mantenimento della pro-MMP nella forma latente; una regione cerniera, ricca in proline, e un dominio che determina la specificità del substrato di ciascuna proteasi. Fino ad ora, sono state identificate 18 diverse MMPs e, a seconda della struttura e della specificità di substrato, sono state divise in sottogruppi: collagenasi, stromelisine, gelatinasi, membrane-type MMPs e altre MMPs (Nagase & Woessner, 1999).

La maggior parte di questi enzimi non è costitutivamente espressa dalle cellule, ma la sua espressione è indotta da segnali esogeni quali citochine, fattori di crescita, ormoni steroidei, contatti alterati tra cellula e matrice e tra cellula e cellula (Birkedal-Hansen et al., 1993; Kahari & Saarialho-Kere, 1997).

L'espressione delle MMPs è regolata a livello trascrizionale, sebbene sia stata documentata una modulazione dell'emivita dei relativi mRNA da parte di fattori di crescita e citochine.

L'attività proteolitica delle MMPs è regolata da un'attivazione enzimatica e dall'inibizione da parte di inibitori specifici (TIMPs, Inibitori Tissutali delle Metalloproteasi) e non specifici ($\alpha 2$ -macroglobulina) (Johansson et al., 2000).

Diversi studi hanno dimostrato una correlazione positiva tra espressione di MMPs e potenziale invasivo e metastatico nei tumori maligni, compreso il carcinoma della prostata (Shapiro, 1998; Kahari & Saarialho-Kere, 1999). Nei tumori maligni, la maggior parte delle MMPs è prodotta da cellule dello stroma non maligne e non dalle cellule tumorali (Basset et al., 1997). Queste ultime possono, però, secernere fattori, come l'induttore extracellulare delle MMPs (EMMPRIN) che promuove l'espressione di alcune di esse da parte dei fibroblasti (Guo et al., 1997). Inoltre, diversi fattori di crescita e citochine secrete da cellule infiammatorie infiltrate nel tumore o da cellule stromali sono in grado di modularne l'espressione.

È interessante il fatto che alcune MMP (MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12) sono in grado di generare angiostatina partendo dal plasminogeno; la loro espressione

nell'area periumorale, quindi, serve per limitare l'angiogenesi indotta dal tumore (Dong et al., 1997; Patterson & Sang, 1997; Lijnen et al., 1998a).

Il componente principale della membrana basale è il collagene di tipo IV; le due gelatinasi MMP-2 (gelatinasi A) e MMP-9 (gelatinasi B), essendo in grado di degradare il collagene di tipo IV, svolgono, quindi, un ruolo importante nella formazione di metastasi.

È stata valutata l'espressione di MMP-2 e dell'inibitore TIMP-2 in tessuti prostatici benigni e maligni. I risultati suggeriscono che uno sbilanciamento tra l'espressione di MMP-2 e TIMP-2 a favore delle proteasi potrebbe essere un fattore critico nella progressione e nella formazione di metastasi nel tumore prostatico; ulteriori studi sono necessari per esaminare il valore prognostico del rapporto tra i livelli serici di questi fattori (Still et al., 2000).

MMP-9 non è espressa da tessuti prostatici normali, mentre è presente in quantità elevata nel tessuto prostatico trasformato (Stearns & Wang, 1993).

Infine, si è rilevato che tumori prostatici invasivi esprimono maggiori quantità di MMP-7 (detta anche Matrilisina) rispetto al tessuto normale (McDonnel et al., 1991).

Il Sistema Attivatore del Plasminogeno

Il sistema attivatore del plasminogeno è coinvolto in numerosi processi quali trombolisi, infiammazione, migrazione cellulare, ovulazione, embriogenesi, angiogenesi, rimodellamento, desmoplasia (ovvero la stimolazione della proliferazione dei fibroblasti e della sintesi di proteine della matrice extracellulare) (Dvorak et al., 1995; Hanahan & Folkman, 1996; Tremblay, 1979; Nagy et al., 1989). Di particolare interesse ai fini di questa trattazione, è il suo ruolo nel meccanismo di invasione tumorale e di formazione di metastasi.

Gli attivatori del plasminogeno sono costituiti da serino-proteasi prodotte e rilasciate dalle cellule tumorali che catalizzano la conversione da plasminogeno a plasmina; quest'ultima, a sua volta, possiede attività proteasica diretta contro le proteine della membrana basale e della matrice extracellulare (ECM), eventi cruciali nei processi di invasione di cellule tumorali nei tessuti circostanti (Mignatti & Rifkin, 1993; Werb, 1997; Danø et al., 1985).

Esistono due tipi di attivatori del plasminogeno ed entrambi sono in grado di catalizzare le medesime reazioni: l'uPA (urokinase-type plasminogen activator) e il tPA (tissue-type plasminogen activator). I due sistemi si differenziano in quanto l'uPA sembra essere più importante nel rimodellamento dei tessuti e nella biologia dei tumori, mentre il tPA sembra agire prevalentemente attivando la plasmina a livello dei vasi sanguigni per permettere il processo di fibrinolisi. A differenza di altre proteasi, uPA ha una specificità di substrato più ristretta.

Il sistema attivatore del plasminogeno comprende un recettore di membrana, chiamato uPAR (recettore per l'uPA), che localizza l'attivazione del plasminogeno sulla superficie cellulare, e due inibitori principali appartenenti alla famiglia delle serpine (inibitori di serino-proteasi), il PAI-1 e il PAI-2 (plasminogen activator inhibitor-1 e -2) (Mignatti & Rifkin, 1993).

L'intero sistema ha un ruolo primario nella crescita, invasività e capacità metastatica del tumore intesa come rimodellamento tissutale diretto dalle cellule cancerose, come evidenziato da diverse prove sperimentali, riscontrate in modelli animali; infatti, l'inibizione dello stesso uPA e/o della sua interazione con uPAR previene e riduce le metastasi in tali modelli. Inoltre, la sovraespressione dei diversi componenti del sistema uPA in cellule non metastatiche, ne aumenta il potenziale metastatico.

Il diverso livello di espressione dei componenti del sistema uPA risulta quindi essere correlato sia col potenziale metastatico di linee cellulari in vitro, sia con la progressione dei tumori e la sopravvivenza dei pazienti in vivo. Un'ulteriore evidenza di questo è data dal fatto che la crescita e la progressione del tumore sono più lente nei topi mutati geneticamente per essere privi dei geni che codificano per i vari componenti del sistema attivatore del plasminogeno (Sidenius & Blasi, 2003).

Una correlazione importante esiste inoltre fra il sistema dell'uPA e la progressione della patologia tumorale in tumori ormono-dipendenti come quello prostatico, della mammella (Mangel et al., 1988), dell'endometrio (Fujimoto et al., 1996) e ovarico (Amin et al., 1987), ma anche in altri tipi di tumore, ad esempio quelli gastrointestinali (Duffy & Duggan, 2004).

- uPA

Il gene che codifica per l'uPA è presente in un'unica copia localizzata sul braccio lungo del cromosoma 10 e contiene 11 sequenze esoniche. Esistono differenze genomiche specie-specifiche, probabilmente dovute a varianti alleliche, che però non sono associate a variazioni nella sequenza aminoacidica.

Il promotore del gene dell'uPA contiene tre sequenze GGGCGG, comprese tra CAAT-box e TATA-box, che sembrano necessarie per la modulazione esercitata da ormoni e fattori di crescita sul gene stesso (Riccio et al., 1985).

La serino-proteasi uPA è sintetizzata in forma inattiva come precursore, (pro-uPA), una glicoproteina a catena singola con un'attività di circa 250 volte inferiore rispetto all'uPA a catena doppia, che rappresenta la forma più attiva della proteasi (Petersen et al., 1988). L'uPA ha un peso molecolare di 50-54 kDa, e le due catene polipeptidiche, A e B, sono unite da un ponte disolfuro. La catena A rappresenta la porzione ammino-terminale e contiene un "growth factor domain" (GFD), di struttura simile all'EGF, un dominio "kringle" (dominio autonomo, probabilmente importante per l'attività proteolitica) e una regione "linker" di connessione tra questi due domini; la catena B, carbossi-terminale, contiene invece il dominio serino-proteasico.

Pro-uPa e uPA legano un recettore specifico, uPAR, con la stessa affinità (Kd dell'ordine delle nanomoli) (Cubellis et al., 1986). La conversione del precursore nella forma più attiva avviene per taglio proteolitico del singolo legame peptidico tra Lys¹⁵⁸ e Ile¹⁵⁹ catalizzato dalla serino-proteasi plasmina e da altre proteasi (Danø et al., 1985; Andreasen et al., 1997).

La molecola di uPA può subire altri tagli proteolitici da parte di altre metalloproteasi della matrice, per esempio a livello della regione linker; da questo taglio, si originano il frammento ammino-terminale ATF, che comprende il growth factor domain e il dominio kringle, e uPA a basso peso molecolare (LMW-uPA, ossia Light Molecular Weight uPA), che include il dominio serino-proteasico e parte della regione linker (Rabbani et al., 1992) (Figura 1).

Il plasminogeno è il precursore a singola catena della plasmina, ed ha un'attività inferiore a questa di circa 10^4 - 10^6 volte; la conversione avviene per taglio proteolitico di un singolo legame peptidico tra Arg⁵⁶¹ e Val⁵⁶² esercitato da uPA o tPA. La plasmina, in seguito a questo taglio, risulta essere costituita da due catene

polipeptidiche unite da ponti disolfuri, del peso molecolare complessivo di 90 kDa circa; la catena A costituisce l'estremità amino-terminale e contiene cinque domini kringle, la catena B è invece la porzione C-terminale e contiene il tipico dominio serino-proteasico responsabile dell'attività catalitica dell'enzima (Danø et al., 1985; Mignatti & Rifkin, 1993; Collen, 1980). La plasmina catalizza l'idrolisi di legami peptidici in corrispondenza dell'estremità C-terminale di residui di Lys o Arg.

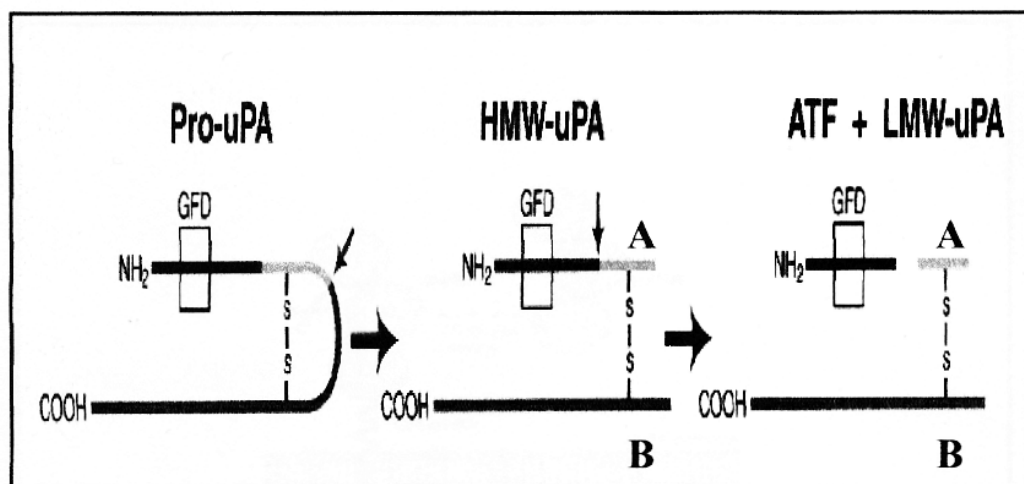


Figura 1: Il precursore a singola catena, pro-uPA, viene tagliato (→) e si crea una molecola formata da due catene polipeptidiche (A e B) chiamata uPA ad alto peso molecolare (HMW-uPA). Le due catene A e B di HMW-uPA sono collegate da un ponte disolfuro (S-S). La catena A di HMW-uPA può essere ulteriormente tagliata a dare uPA a basso peso molecolare (LMW-uPA) e un frammento amino-terminale (ATF) che contiene un "Growth Factor Domain" (GFD).

Pro-uPA legato a uPAR viene attivato rapidamente a uPA che può così iniziare la sua azione catalitica a livello pericellulare, attivando plasminogeno a plasmina, che è una proteasi aspecifica responsabile della degradazione di fibrina e di altre proteine della ECM (Andreasen et al., 1997). La plasmina, inoltre, è responsabile dell'attivazione di TGF-β latente e del rilascio di bFGF dai suoi siti di legame presenti sulla ECM (Mignatti & Rifkin, 1993). Infine, essa può contribuire all'attivazione di metalloproteasi a partire dai precursori, in particolare MMP-3, MMP-9 e MMP-13 (Matrisian, 1992), mentre la regolazione dell'attività di MMP-2 sembra essere più complessa (Carmeliet et al., 1997; Lijnen et al., 1998b).

- PAI-1 e PAI-2

L'attività del sistema attivatore del plasminogeno è controllata dalla presenza degli inibitori PAI-1 e PAI-2. Essi appartengono alla famiglia delle serpine (inibitori delle serino-proteasi) e agiscono reprimendo l'interazione tra uPA e uPAR ed i suoi effetti. Al fine di tale meccanismo inibitorio, è essenziale un segmento di circa 20 aminoacidi, definito "reactive center loop" (RCL), il quale si lega al sito attivo della proteasi formando un complesso stabile che impedisce il legame di uPA al suo recettore; questa reazione avviene in rapporto stechiometrico 1:1 (Carrel & Stein, 1996; Gils & Declerck, 1998).

PAI-1 è però in grado di bloccare uPA anche quando questo è già legato al recettore. Il legame di PAI-1, infatti, modifica le caratteristiche del recettore, poiché il complesso uPA/PAI-1 che si forma rivela anche un sito di legame per il related-peptide del recettore per LDL (LRP).

Attraverso un'azione combinata su uPAR e LRP, PAI-1 promuove l'internalizzazione nella cellula del complesso uPA/PAI-1/uPAR, dopo aver causato il distacco del recettore dalle integrine della ECM; con un meccanismo di tipo endosomico, uPA e PAI-1 vengono degradati dagli enzimi litici della cellula, mentre uPAR viene riciclato sulla superficie cellulare. Quindi, PAI-1 controlla non solo l'attività proteolitica sulla superficie della cellula, ma anche la disposizione fisica del recettore sulla membrana plasmatica (Cubellis et al., 1989). Questa, però, non dipende unicamente dal riciclo del recettore indotto da PAI-1, ma anche dalla mobilitazione di uPAR sulla membrana stessa stimolata dall'interazione col ligando uPA (Myohanen et al., 1993).

PAI-1, che è l'inibitore principale del sistema ed è regolato da diversi ormoni, citochine e fattori di crescita, lega con elevata affinità anche la vitronectina (Vn), in competizione con uPAR e integrine, perché i siti di legame sulla Vn per questi tre ligandi sono molto vicini. Per questo motivo, l'inibitore interferisce con l'adesione, il distacco e la migrazione cellulare (Deng et al., 1996a; Montuori et al., 2002; Czekay & Loskutoff, 2004). PAI-1 legato alla Vn è ancora in grado di inattivare uPA, ma il complesso uPA/PAI-1 che si forma perde affinità per la Vn e viene rilasciato rapidamente (Deng et al., 1996b). Infatti, cellule trattate con PAI-1 mostrano un rapido riarrangiamento del citoscheletro di actina, una perdita di adesioni focali e

un'assunzione del fenotipo migratorio (Czekay & Loskutoff, 2004). Questo evento si riscontra, però, solo in cellule che esprimono il complesso uPA/uPAR/integrine.

PAI-1 interagisce rapidamente sia con uPA che con tPA (Andreasen et al., 1997), mentre non è noto se PAI-1 è in grado di interagire col suPAR.

PAI-2 interagisce con gli stessi ligandi ma, rispetto a PAI-1, la reazione è più lenta con entrambe le proteasi (Duffy & Duggan, 2004).

Un ultimo inibitore è correlato a questo sistema; si tratta dell' $\alpha 2$ -antiplasmina, inibitore primario della plasmina che ne riduce l'emivita nel sangue e nei tessuti e, quindi, anche l'effetto proteasico.

I componenti del sistema uPA sono target potenziali di una terapia anti-invasiva e anti-metastatica. L'obiettivo consiste nel cercare di bloccare selettivamente e specificamente l'attività enzimatica di uPA senza coinvolgere tPA, cioè evitando di influenzare il processo fibrinolitico (Ke et al., 1997).

Altri potenziali target consistono nell'inibizione delle interazioni uPA/uPAR, Vn/uPAR e integrine/uPAR. E' stato identificato un antagonista peptidico, all'interno di una libreria fagica, dell'interazione uPA/uPAR, che, legandosi al recettore tra i domini D1 e D3, compete con uPA per il legame al recettore stesso (Goodson et al., 1994). L'interazione tra Vn e uPAR, espressi ad alti livelli in glioblastomi e in carcinomi epatocellulari, induce riarrangiamenti nel citoscheletro e un aumento della mobilità cellulare (Kjøller & Hall, 2001) e, quindi, potrebbe contribuire al fenotipo fortemente maligno di questi tumori. Infine, dai risultati di uno studio condotto in vivo su cellule tumorali MDA-MB231, transfettate stabilmente con un peptide (peptide 25) capace di bloccare l'interazione integrine/uPAR, si è osservata una significativa riduzione della progressione tumorale a livello osseo nell'animale (Wei et al., 1996).

Altra strategia terapeutica consiste nell'inibizione della biosintesi dei componenti del sistema uPA mediante l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso (Schmitt et al., 1997).

- Il recettore per l'uPA (uPAR)

Il gene del recettore per l'uPA, è stato localizzato sul braccio lungo del cromosoma 19 (Vagnarelli et al., 1992), e codifica per una sequenza aminoacidica che può essere suddivisa in tre domini: D1 (N-terminale), D2 e D3 (C-terminale). A

livello del dominio D3, il recettore presenta un residuo di glicosil fosfatidil inositolo che lo lega alla membrana cellulare (ancora-GPI). Il sito primario di interazione con il ligando uPA è costituito dal dominio D1, mentre D2 e D3 sono siti di legame accessori; l'intera struttura del recettore è comunque essenziale per un efficiente legame all'uPA (Montuori et al., 2005). L'affinità di legame è assicurata dal dominio EGF-like di uPA e il legame stesso è stabilizzato dal dominio kringle del ligando. Nel dominio D3 risiede invece l'attività proteolitica del recettore.

Nella Figura 2 è illustrato, il sistema attivatore del plasminogeno nei suoi vari componenti.

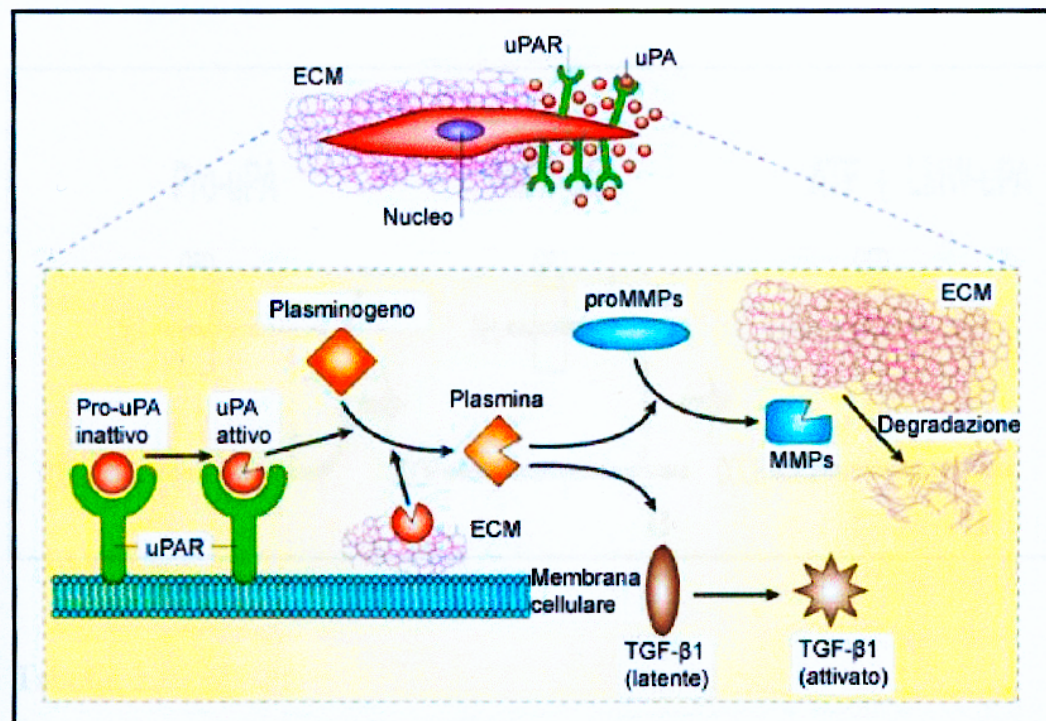


Figura 2: Rappresentazione schematica del sistema attivatore del plasminogeno. Sulla superficie della membrana cellulare, a livello dell'estremità rivolta nella direzione di migrazione, uPAR lega l'urochinasi inattiva (pro-uPA), convertendola nella forma attiva (uPA). L'uPA proteoliticamente attiva converte il plasminogeno (inattivo) in plasmina (attiva), che può degradare la matrice extracellulare o attivare alcuni fattori di crescita latenti come il TGF-β1 (Transforming Growth Factor β1). La plasmina può anche degradare l'ECM indirettamente, attraverso l'attivazione delle pro-MMPs (pro-metalloproteasi della matrice) (Blasi & Carmeliet, 2002).

Oltre ad uPA, uPAR interagisce con un altro ligando, la vitronectina (Vn), proteina prodotta dal fegato e presente in alte concentrazioni nel plasma e in molte forme di ECM (Preissner, 1989).

uPAR interviene inoltre in funzioni indipendenti dall'attività proteasica. E' stato infatti dimostrato che uPAR lega integrine mediante interazioni laterali sulla membrana cellulare, in particolare integrina $\beta 2$, ma anche $\beta 1$ e $\beta 3$ (Wei et al., 1996); in tal modo, uPAR è direttamente implicato nei meccanismi di adesione cellulare e di comunicazione cellula-cellula e cellula-ECM.

Il legame con uPAR determina un accumulo di pro-uPA e di uPA sulla superficie della cellula. Infatti i complessi pro-uPA/uPAR e uPA/uPAR risultano spesso concentrati in siti specifici a livello dei punti di contatto cellula-substrato che, in diversi tipi cellulari, principalmente di origine fibroblastica, corrispondono ai contatti focali, dove le integrine clusterizzano e interagiscono con i filamenti di actina del citoscheletro cellulare (Andreasen et al., 1997). A quest'accumulo di uPA in siti specifici sulla superficie cellulare, sembrano contribuire le interazioni integrine/uPAR e Vn/uPAR.

Ad esempio, in cellule di fibrosarcoma umano HT-1080, l'uPA legato a uPAR è localizzato in corrispondenza dei contatti focali in colture il cui substrato è Vn, ma non in quelle in cui il substrato è fibronectina (Ciambrone & Mckeown-Longo, 1990); nelle stesse cellule, uPAR co-localizza con le subunità integriniche $\beta 1$, mentre è variabile la sua co-localizzazione con le integrine $\beta 3$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ e αV , in funzione della crescita cellulare su substrati di Vn, fibronectina o laminina (Xue et al., 1997).

Il recettore per l'uPA può subire due diverse modificazioni covalenti, indotte da altrettanti tagli proteolitici, che alterano profondamente la funzionalità del recettore stesso.

La prima modificazione consiste in un taglio a livello della regione linker che unisce i domini D1 e D2. Diverse proteasi, rilasciate in loco, attraverso meccanismi paracrini e autocrini, possono operare questo taglio, come elastasi, MMPs, plasmina e uPA stessi (Resnati et al., 1996; Beaufort et al., 2004); da ciò, risulta il rilascio del frammento D1 dal resto del recettore. uPA può rimuovere il dominio D1 da uPAR sia in vivo che in vitro (Montuori et al., 2002). Questa modificazione porta ad un drastico cambiamento delle proprietà biochimiche del recettore, rendendo impossibile il legame del ligando uPA al suo recettore (Høyer-Hansen et al., 1992 e 1997); tale evento fa supporre che plasmina e uPA possano operare una sorta di controllo di tipo inibitorio dell'attività di uPAR (Montuori et al., 2005). In ogni caso, il taglio

proteolitico indotto da uPA e da altre proteasi, ha efficienza limitata e può risultare insufficiente per ridurre l'attività di uPAR.

Il frammento D2-D3 che resta legato alla membrana cellulare, è stato individuato in vivo (Wahlberg et al., 1998) ed è attivo nell'indurre chemiotassi e, quindi, migrazione cellulare se, dopo il taglio proteolitico, conserva la sequenza aminoamida 88-92, chiamata SRSRY (Montuori et al., 2005).

La tossina della pertosse inibisce la chemiotassi indotta da uPA o dal frammento D2-D3, il che significa che in questo meccanismo è implicato un recettore accoppiato a G-protein (GPCR). E' stato identificato il recettore FPRL1 (omologo del Formyl Peptide Receptor, noto anche come recettore della lipossina A4, LXA4), che traduce l'attività chemiotattica del complesso uPA-uPAR attivato. Per l'interazione con questo recettore è essenziale la sequenza SRSRY. uPA sembra indurre un cambiamento conformazionale in uPAR che scopre la sequenza SRSRY, permettendogli di interagire con FPRL1 (Montuori et al., 2005). Per questo motivo, anche l'uPAR che subisce reazione di taglio, con distacco del dominio D1, ma che mantiene la sequenza 88-92, conserva l'attività chemiotattica ma non è più in grado di interagire con integrine (Montuori et al., 2005).

La seconda modificazione proteolitica che uPAR può subire viene chiamata "shedding" e consiste nel taglio proteolitico del recettore in prossimità dell'ancora-GPI, oppure direttamente nel taglio idrolitico della stessa ancora ad opera di una fosfolipasi D (PLD) (Pedersen et al., 1993; Sier et al., 1998) (Figura 3).

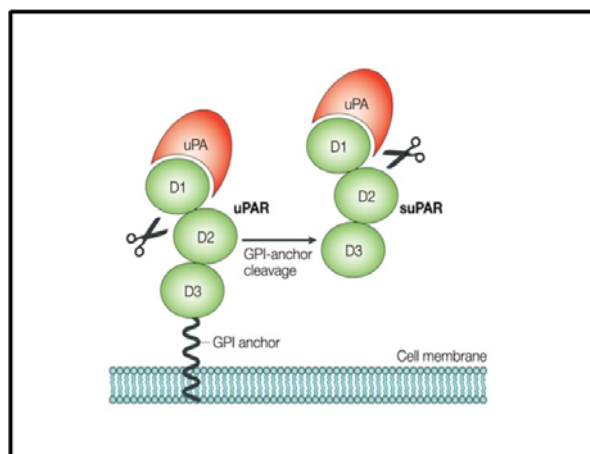


Figura 3: L'uPAR è formato da 3 domini (D1, D2, D3) ed è ancorato alla membrana cellulare per mezzo di un residuo di glicosil fosfatidil inositolo (ancora-GPI). uPAR solubile (suPAR) è rilasciato dalla membrana plasmatica mediante il taglio dell'ancora-GPI (Blasi & Carmeliet, 2002).

L'effetto di questo taglio consiste nel rilascio dell'intero recettore dalla superficie cellulare, senza cambiamenti nelle proprietà di legame dei suoi due ligandi principali (uPA e vitronectina). Questo recettore solubile viene appunto chiamato solubile uPAR (suPAR), ed è stato individuato nel mezzo condizionato di diverse colture cellulari tumorali (Lau & Kim, 1994) e nei fluidi biologici di pazienti malati di cancro (Sier et al., 1998; Mustjoki et al., 2000; Garcia-Monco et al., 2002). suPAR può anche essere generato da splicing alternativo dell'mRNA di uPAR (Jo et al., 2003b).

La rimozione del dominio D1 causa, quindi, la perdita della possibilità di interazione laterale di uPAR con integrine, con conseguente riduzione dei suoi effetti adesivi (Høyer-Hansen et al., 1992; Montuori et al., 2002; Sidenius & Blasi, 2000).

Infine, il frammento tagliato D2-D3 ancorato alla membrana cellulare, poiché conserva il residuo GPI, può ancora subire l'azione della fosfolipasi D ed essere tagliato (Jo et al., 2003a,b).

Tutti questi prodotti possono rappresentare intermedi del metabolismo di uPAR oppure molecole attive con funzioni distinte, regolate in modo indipendente e coinvolte in migrazione e adesione cellulare in modo differente (Montuori et al., 2005).

I livelli della porzione solubile del recettore (suPAR), presente comunque nel plasma di individui sani, aumentano drammaticamente in pazienti affetti da varie forme di tumore, tra cui cancro alle ovaie, al colon, al polmone, alla mammella, alla prostata e nella leucemia (Pappot et al., 1997; Riisbro et al., 2002; Brunner et al., 1999).

Sebbene ancora oggi il ruolo svolto dal suPAR in pazienti affetti da patologia tumorale sia lungi dall'essere completamente chiarito, recenti evidenze sperimentali suggeriscono che questa molecola possa intervenire nel controllo dell'attività del sistema attivatore del plasminogeno.

Da studi effettuati in topi nudi xeno-trapiantati, sembra che suPAR riduca crescita e metastasi tumorali di cellule di cancro alla mammella e di cancro all'ovaio (Krüger et al., 2000; Lutz et al., 2001).

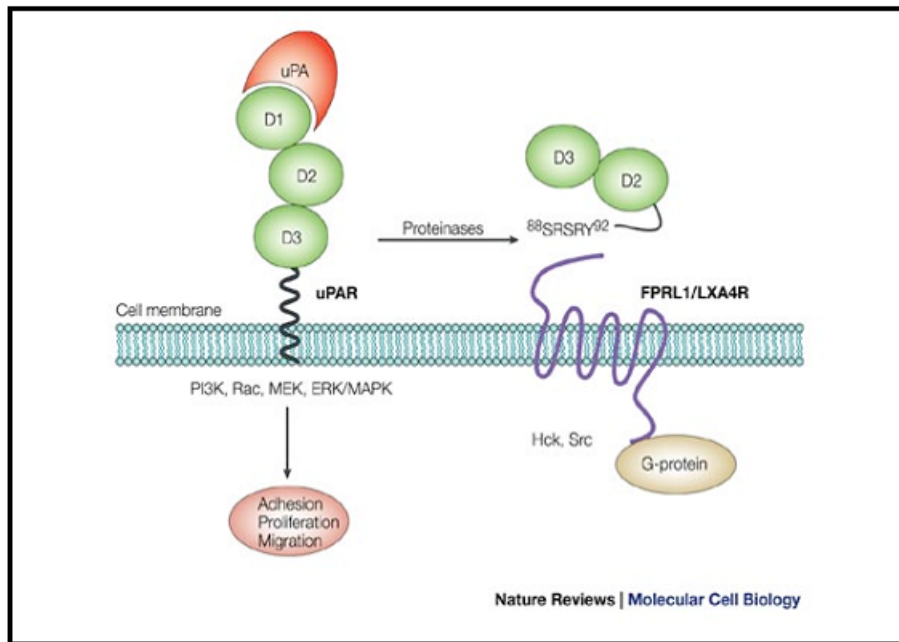


Figura 4: Il frammento D2-D3 solubile è generato da due tagli proteolitici consecutivi dell'uPAR: il primo a livello dell'ancora-GPI (suPAR), il secondo all'altezza della regione linker tra D1 e D2. E' posta in evidenza la sequenza aminoacidica 88-92 SRSRY, essenziale per l'interazione con FPRL1 (Blasi & Carmeliet, 2002).

I meccanismi attraverso i quali il suPAR agirebbe da “antagonista” nella progressione metastatica non sono stati ancora ben identificati. Inoltre la letteratura è discorde riguardo il suo ruolo ed i suoi effetti.

Secondo le ipotesi più accreditate, il suPAR potrebbe agire da “scavenger” per uPA (Resnati et al., 1996, 2002), prevenendo la sua interazione con uPAR ancorato alla membrana e rimuovendo, così, la causa della degradazione proteolitica pericellulare, come si è potuto osservare in vivo mediante l'utilizzo di suPAR ricombinante (Krüger et al., 2000; Wilhelm et al., 1994). Il suPAR blocca, perciò, la via di segnale di uPAR in maniera uPA dipendente, riducendo l'invasione in modo significativo. Alti livelli di suPAR inibiscono la crescita di un tumore primario ortotopico e di metastasi *in vivo* ed *in vitro*.

Al contrario, il suPAR sembra funzionare da parziale agonista in cellule che non esprimono uPAR (Le et al., 2002; De Paulis et al., 2004). Esso acquista funzione agonista anche in seguito al taglio proteolitico con rimozione del dominio D1, sempre a condizione che mantenga la sequenza 88-92, poiché la reazione di taglio lascia sequenze variabili all'estremità N-terminale (Resnati et al., 1996; Andolfo et al., 2002; Beaufort et al., 2004) (Figura 4).

Sono state avanzate ipotesi alternative sul ruolo del suPAR: esso potrebbe limitare in maniera diretta la progressione metastatica, modulando ed inibendo l'attivazione di ERK, come riportato in studi effettuati su cellule di tumore alla mammella (Jo et al., 2003a). Elevati livelli di uPA-uPAR agiscono da segnale autocrino per la fosforilazione di ERK. Infatti, in cellule A1 MEF, ottenute da embrioni k.o. per il gene di uPAR, viene meno questo segnale autocrino e i livelli di ERK fosforilato risultano essere estremamente bassi; invece, in cellule MDA-MB231 derivate da un tumore alla mammella e che, quindi, esprimono elevati livelli di uPA e uPAR, l'attivazione basale di ERK è molto elevata. Trattando le cellule MDA-MB231 col suPAR, si è riscontrata una riduzione della fosforilazione di ERK; questa diminuzione, probabilmente causata dallo spostamento competitivo del complesso uPA/uPAR ancorato alla membrana, sembra essere dose-dipendente (Jo et al., 2003a).

Il suPAR compete con uPAR nel legame a uPA, vitronectina (Vn) e integrine (Resnati et al., 1996, 2002); esso può comunque attivare le integrine, inducendo la fosforilazione di ERK in cellule che hanno il sistema uPA-uPAR quiescente, anche se in misura minore che in cellule uPAR-positive (Wei et al., 1996).

Il suPAR sembra anche promuovere la morte cellulare programmata (apoptosi) in cellule nelle quali blocca l'attivazione di ERK.

Infine, Piironen et al. (2006) hanno evidenziato come l'analisi delle differenti forme di uPAR presenti nel siero di pazienti colpiti da CaP, aumentino la capacità di discriminare tra i diversi stadi di malignità del CaP stesso. Questi autori hanno osservato infatti che i livelli sierici della porzione D1, così come la porzione D2-D3 dell'uPAR, siano più elevati in pazienti con tumori maligni rispetto ad individui con forme non maligne. Secondo questi autori le differenti forme dell'uPAR potrebbero quindi essere utilizzate come markers diagnostici e prognostici più potenti rispetto alla forma intatta del recettore con i domini D1-D2-D3 ed in maniera complementare rispetto all'analisi dei livelli di PSA.

SCOPO DELLA RICERCA

Il carcinoma della prostata (CaP) è un tumore invasivo la cui crescita è inizialmente sotto il controllo del testosterone (T) e del suo più importante metabolita 5-alpha ridotto, il diidrotestosterone (DHT). Il trattamento terapeutico d'elezione è rappresentato, oltre che da farmaci antiandrogeni, dal trattamento con agonisti ed antagonisti del GnRH; tali farmaci sono in grado di indurre il loro effetto antitumorale attraverso il blocco dell'attività dell'asse ipofisi-testicolo. Tuttavia, tale terapia non è risolutiva. Infatti, dopo un'iniziale responsività al trattamento con bloccanti ormonali, una quota significativa di CaP sfugge all'androgeno-dipendenza, progredisce e dà luogo a metastasi. I processi d'invasione e metastasi risultano strettamente correlati con fenomeni di degradazione controllata della matrice extracellulare (ECM) indotti da attività proteasiche rilasciate dalle cellule tumorali. In particolare, molte ricerche suggeriscono un forte coinvolgimento del sistema attivatore del plasminogeno (uPA, gli inibitori PAI-1/2 ed il recettore per l'uPA, uPAR) nella progressione e nell'invasione del CaP. Dati presenti in letteratura hanno evidenziato la presenza di recettori per il GnRH anche a livello del tessuto di carcinoma prostatico umano, in campioni di ipertrofia prostatica, oltre che in diverse linee di carcinoma prostatico umano. Nella prima parte di questa tesi sono riportati i risultati relativi al ruolo di agonisti ed antagonisti del GnRH nei meccanismi di progressione ed invasione del CaP in fase di androgeno-indipendenza.

Per tali studi sono state utilizzate le linee di carcinoma prostatico umano androgeno-indipendente DU145 e PC3. Nei surnatanti e negli estratti cellulari delle cellule DU145 e PC3 si è studiato l'effetto di un analogo agonista (Leuprolide) ed un antagonista (Cetrorelix) del GnRH sulla proliferazione cellulare, sulla modulazione dell'attività dell'uPA e del suo inibitore PAI-1. Si è inoltre studiato l'effetto degli analoghi del GnRH sulle capacità migratorie ed invasive delle cellule di CaP in risposta a stimoli apoptotici.

Successivamente, utilizzando tecniche di immunofluorescenza e Western Blotting, si è studiata l'espressione dell'uPAR nelle cellule DU145 e PC3 trattate con agonisti ed antagonisti del GnRH. Inoltre, poiché è noto che il recettore per l'EGF (EGFR) gioca un ruolo fondamentale nelle vie di trasduzione uPAR-dipendenti,

abbiamo valutato anche l'effetto del trattamento con gli analoghi dell'GnRH sull'espressione e sulla fosforilazione di EGFR e di ERK1/2.

Dati presenti in letteratura suggeriscono che il trattamento con la porzione solubile del recettore dell'uPA sia in grado di antagonizzare la progressione metastatica di vari tipi di tumori fra cui mammella ed ovaio. Tuttavia il meccanismo attraverso cui il suPAR agisce *in vivo* è ancora poco chiaro. Pertanto, nella seconda parte di questa tesi sono riportati i relativi studi effettuati per approfondire il ruolo del suPAR nei processi di proliferazione, migrazione ed invasione delle cellule di CaP.

Inoltre sono stati condotti studi per valutare la fosforilazione di ERK1/2 in cellule di CaP umano androgeno-indipendenti DU145.

MATERIALI E METODI

Prodotti chimici

Il medium di coltura RPMI 1640, la L-glutammina, la tripsina/EDTA (0.05%-0,02%), il PBS senza calcio e magnesio sono stati acquistati dalla Biochrom K.G. (Berlino, Germania). Il siero fetale bovino (FBS), gli antibiotici (Penicillina G sodica e streptomicina) sono stati ottenuti dalla GIBCO Laboratories (USA).

- 1) Gli analoghi GnRH-A (Leuprolina acetato) e GnRH-ANT (Cetrorelix) per i trattamenti cellulari sono stati acquistati, rispettivamente, da Takeda Chemical Industries, LTD (Osaka, Giappone) e da Asta Medica AG (Francoforte); essi sono stati disciolti in RPMI privo di FBS.
- 2) Il suPAR umano ricombinante è stato acquistato presso la R&D Systems (Minneapolis, USA); esso è stato dissolto in tampone PBS sterile contenente albumina sierica bovina (0,1%), per preparare una soluzione di stock di 20 µg/ml.

Colture cellulari

Le linee cellulari DU145 e PC3 sono state fornite dall'American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Le cellule DU145 sono state ottenute da una metastasi cerebrale di tumore prostatico umano androgeno-indipendente (Stone et al., 1978; Hartley-Asp & Gunnarson, 1982), le cellule PC3 da una metastasi ossea di tumore prostatico umano androgeno-indipendente (Kaighn et al., 1979; Tang et al., 1998). Le cellule sono state fatte crescere in monostrato e mantenute in incubatore a 37°C, con atmosfera modificata, ed in presenza del 5% di CO₂.

Le cellule sono state propagate nel medium RPMI 1640 a cui sono stati aggiunti: 100 mg/ml di streptomicina solfato, 100 U.I./ml di penicillina G potassica, L-glutammina 1 mM e siero fetale bovino al 5%.

Il mezzo di coltura veniva cambiato ogni 2/3 giorni, e le cellule venivano tripsinizzate, utilizzando una soluzione allo 0.5% (p/v) di tripsina e allo 0.02% (p/v) di EDTA, con frequenza settimanale.

Studi di proliferazione cellulare

Trattamenti con gli analoghi del GnRH

Le cellule DU145 e PC3 sono state seminate in piastre da 100 mm alla densità di 10.000 cellule/10ml di RPMI 1640, addizionato col 5% di FBS. Il giorno successivo, le cellule, suddivise a gruppi, sono state trattate con diverse concentrazioni di GnRH-A (10^{-10} - 10^{-8} - 10^{-6} M) o GnRH-ANT (10^{-10} - 10^{-8} - 10^{-6} M). I trattamenti sono stati effettuati a giorni alterni per un periodo di 6 giorni. Al termine dei suddetti trattamenti, le cellule sono state raccolte e contate con emocitometro. I dati ottenuti dagli studi di proliferazione cellulare sono stati confrontati con quelli ottenuti da cellule di controllo non trattate e, poi, analizzati secondo il test di Tuckey dopo analisi della varianza (ANOVA).

Trattamenti con il suPAR ricombinante umano

Le cellule DU145 sono state seminate in piastre da 100 mm alla densità di 10.000 cellule/10ml di RPMI 1640, completato col 5% di FBS. Il giorno successivo, le cellule, suddivise in gruppi, sono state trattate con diverse concentrazioni di suPAR (10^{-9} - 10^{-8} M). Al termine dei trattamenti, le cellule sono state raccolte e contate con emocitometro. I dati ottenuti dallo studio di proliferazione cellulare sono stati confrontati con quelli ottenuti dalle cellule di controllo, non trattate, e successivamente analizzati secondo il test di Tuckey, dopo analisi della varianza (ANOVA).

Incorporazione di [3 H] Timidina

Per valutare la capacità proliferativa delle cellule DU145 trattate col suPAR rispetto a quelle non trattate, è stato eseguito un test di incorporazione di timidina marcata radioattivamente. Le cellule DU145, tripsinizzate, centrifugate e risospese, sono state seminate in multiwell da 24 pozzetti (50.000 cellule/500 μ l di medium RPMI 1640 in ciascun pozzetto). Raggiunta la confluenza desiderata, le cellule sono state trattate con dosi crescenti di suPAR (10^{-9} - 10^{-8} M). La multiwell è stata successivamente posta in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata ed in presenza del 5% di CO₂. 100 μ l di soluzione di timidina marcata con trizio (3 H), preparata diluendo 50 μ l della soluzione madre di timidina triziata (1.0mCi/ml) in 2450 μ l di

RPMI senza siero, sono stati addizionati a ciascun pozzetto. La multiwell è stata, quindi, incubata a 37°C per le ultime 6 ore di trattamento. Successivamente, sono stati eseguiti, nell'ordine, un lavaggio in tampone fosfato PBS con Ca^{2+} e Mg^{2+} , un'incubazione con TCA a 4°C per 30 minuti, un secondo lavaggio con etanolo, fino a completa evaporazione di quest'ultimo, e un'altra incubazione con NaOH 0,2N a 37°C per 30 minuti. Le cellule sono state poi staccate meccanicamente dal fondo dei pozzetti, trasferite, in soluzione, nelle apposite "vials" contenenti il liquido di scintillazione (Instagel Plus[®]) e, infine, si è effettuata la misurazione della radioattività (cpm), mediante l'utilizzo di un Beta counter (Packard[®]).

Analisi FACScan (analisi del ciclo cellulare ed apoptosi)

Le cellule DU145 sono state tripsinizzate, raccolte insieme al supernatante cellulare contenente le cellule apoptotiche e centrifugate. Le cellule (1×10^6) sono state lavate in PBS e fissate con l'aggiunta di 1ml di etanolo al 70%. Dopo 30 minuti di fissazione le cellule sono state centrifugate (720g x 5 minuti), e risospese in 1ml di una soluzione di colorazione del DNA (PBS contenente 200mg/ml di RNasi A, 20mg/ml propidio ioduro più 0.1% Triton X-100) e lasciate per 1 ora a temperatura ambiente. Tutte le cellule sono state contate con un FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, UK) con un laser all'argon con lunghezza d'onda di eccitazione di 488nm, quindi analizzate usando il software Cell Quest (Becton Dickinson). Tutte le analisi del flusso citometrico sono state effettuate con lo stesso strumento di settaggio; sono state misurate circa 10.000 cellule in ogni campione. Le cellule apoptotiche sono state quantificate analizzando l'area sottesa alla curva della fase G_0/G_1 il cui picco corrispondeva alla luce rossa emessa dai nuclei diploidi delle cellule. I risultati sono espressi come percentuale di cellule DU145 in apoptosi a seguito del trattamento per 24 ore con suPAR (10^{-8}M) rispetto alle cellule di controllo non trattate.

Analisi dell'attività enzimatica dell'attivatore del plasminogeno

Le analisi sugli attivatori del plasminogeno sono state condotte in multiwells da 96 a fondo piatto (Nunc Denmark), utilizzando S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilide diidrocloreuro, Sigma) come substrato della plasmina. Il mezzo condizionato proveniente dalle colture di cellule (10µl) è stato incubato per 4 ore a

temperatura ambiente, in un tampone contenente Tris-HCl 100mM, pH 8.8, e Triton X-100 allo 0.5%, a cui sono stati aggiunti 2.8µg di plasminogeno. Il saggio sull'attività della plasmina è stato avviato aggiungendo 50µg del substrato S-2251 ad un volume finale di 100µl. Il cambiamento di assorbanza a 405nm è stato monitorato con un lettore di piastre multiscan Titertek (BioRad). L'attività enzimatica è stata determinata sottraendo i valori trovati per i medium condizionati incubati senza plasminogeno da quelli ottenuti incubando con plasminogeno. Un inibitore della plasmina (D-Val-Phe-Lys-CMK, Sigma) è stato utilizzato per confermare che la degradazione del substrato dipendesse effettivamente dall'attivazione del plasminogeno. Ogni campione è stato dosato in triplicato ed i risultati sono stati espressi come media \pm SD di 6 campioni.

Trattamenti con gli analoghi del GnRH

Le cellule DU145 e PC3 sono state piastrate in multiwell da 24 (NUNC) ad una densità di 150.000 cellule/pozzetto in 500µl di RPMI 1640 addizionato con 5% di FBS. Dopo 24 ore veniva rimosso il medium dalle colture cellulari ed aggiunto 1ml di RPMI-1640 questa volta privo di FBS. Dopo 24 ore di trattamento con dosi diverse di GnRH-A (10^{-8} - 10^{-6} M) o GnRH-ANT (10^{-8} - 10^{-6} M), i surnatanti delle cellule sono stati raccolti, centrifugati (13.000rpm x 10minuti) ed utilizzati per l'analisi dell'attività di PA.

Dosaggio immunoenzimatico di uPA

Per quantificare l'ammontare dei livelli di uPA nel mezzo condizionato delle cellule è stato utilizzando un saggio immunoenzimatico specifico. Il metodo da noi utilizzato ci ha permesso di dosare sia il pro-uPA che l'uPA attivo presente nel mezzo condizionato delle cellule.

Micropiastre da 96 pozzetti sono state rivestite con 2µg/ml di anticorpo monoclonale contro uPA (MoAb#3689; American Diagnostica), in un tampone contenente NaHCO₃ 0.1 M, pH 9.8, per 18 ore, a 4°C. L'anticorpo non legato è stato rimosso e i siti di legame in eccesso sono stati bloccati aggiungendo l'1% di BSA (Albumina di Siero Bovino) al tampone bicarbonato. Le piastre sono state lavate tre volte con un tampone contenente sodio fosfato 50mM, pH 7.2, NaCl 0.1 M e 0.05%

Tween 20. Nelle piastre così preparate sono stati aggiunti i mezzi condizionati delle cellule trattate e non per 48 ore; ogni campione è stato dosato in triplicato.

Le piastre sono state incubate per 2 ore a 37°C e, successivamente, lavate.

Il pro-uPA è stato convertito in uPA attivo tramite incubazione con la plasmina. In seguito all'aggiunta del plasminogeno, l'uPA totale è stato misurato con il substrato cromogenico S-2251 come già illustrato precedentemente.

Trattamenti con gli analoghi del GnRH

L'analisi è stata effettuata sui surnatanti delle cellule DU145 e PC3, trattate e non con dosi crescenti di GnRH-A (10^{-8} - 10^{-6} M) o GnRH-ANT (10^{-8} - 10^{-6} M), dopo 8 e 24 ore di trattamento.

Analisi zimografica di uPA

L'analisi zimografica dell'uPA secreto nel mezzo condizionato delle cellule è stata effettuata mediante l'impiego di gel di poliacrilamide-SDS (7.5%), co-polimerizzati con caseina priva di lattosio (0.1%) (Sigma, St Louise, MO, USA), in condizioni non riducenti, in presenza di 15µg/ml di plasminogeno umano per l'espressione dell'attività urochinasica. I campioni, in triplicato, normalizzati come concentrazioni di proteine, sono stati diluiti in un tampone di caricamento per SDS-PAGE in condizioni non riducenti e senza bollitura. Dopo elettroforesi, i gel sono stati lavati tre volte, per 5 minuti, in una soluzione contenente Tris 50mM, pH 7.5, 2% Triton X-100 e risciacquati tre volte in Tris 50mM a pH 7.5. I gel sono stati poi incubati in un tampone contenente Tris 50mM, NaN₃ 0.02%, pH 7.5, per 4 ore a 37°C in ambiente modificato. I gel sono stati colorati con Blue Coomassie R 250 (Bio Rad Hercules, CA, USA) allo 0.1%, in una miscela di metanolo: acido acetico: acqua (3:1:6) per 1 ora e decolorati nella stessa miscela priva di colorante (destain). Le bande di attività enzimatica sono state evidenziate come bande bianche su uno sfondo scuro di caseina colorata non degradata e ciascuna di esse è rappresentativa di tre campioni. La specificità dell'analisi zimografica era assicurata da un gel di poliacrilamide-SDS co-polimerizzato con caseina ma senza plasminogeno o utilizzando inibitori della serino proteasi addizionati al tampone di incubazione.

Trattamenti con gli analoghi del GnRH

L'analisi è stata effettuata sui surnatanti delle cellule DU145 e PC3, trattate e non con dosi crescenti di GnRH-A (10^{-8} - 10^{-6} M) o GnRH-ANT (10^{-8} - 10^{-6} M), dopo 8 e 24 ore di trattamento.

Analisi Western Blotting

Il medium delle cellule è stato concentrato mediante diafiltrazione con provette Microcon 30'000 (Amicon Centricon); le cellule sono state raccolte in tampone RIPA, addizionato di inibitori delle proteasi. Nel surnatante, ottenuto da centrifugazione, è stata determinata la concentrazione proteica mediante metodo Bradford. Le proteine sono state sottoposte a separazione elettroforetica su gel di poliacrilammide al 7.5-10% (SDS-PAGE), per 1,5 ore a 110 Volt. Quindi le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa, mediante utilizzo di un Trans Blot semi-dry (BIO-RAD). A seguito di lavaggi in TBST 1X (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20), la membrana è stata immersa in una soluzione di blocco (5% p/v latte in TBST 1X) e quindi incubata con anticorpo primario (PAI-1 1:100, Oncogene; uPAR 1:50, FL-290, Santa Cruz, CA; P-EGFR 1:50, Tyr 1173, Santa Cruz, CA; EGFR 1:100, 1005, Santa Cruz, CA; P-ERK, 1:150, E-4, Santa Cruz, CA; ERK1/2, 1:1000, K-23, Santa Cruz, CA) o/n a 4°C; l'anticorpo primario riconosce entrambe le isoforme, P-ERK/ERK 1/2. Dopo l'incubazione, la membrana è stata lavata con TBST 1X e incubata per un'ora con un anticorpo secondario anti-rabbit HRP (Horse Radish Peroxidase, Santa Cruz, CA). Le bande immunoreattive sono state visualizzate usando un kit per detection che amplifica la chemiluminescenza (ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Bioscience, UK). Tutti i dati ottenuti con l'analisi Western Blotting sono stati normalizzati per actina.

Trattamenti con gli analoghi del GnRH

L'analisi è stata effettuata su lisati cellulari e su media concentrati di cellule DU145 e PC3 trattate e non per 6 giorni con dosi crescenti di GnRH-A (10^{-8} - 10^{-6} M) o GnRH-ANT (10^{-8} - 10^{-6} M).

Trattamenti con il suPAR umano ricombinante

L'analisi è stata effettuata sui lisati di cellule DU145, mantenute per 18 ore in assenza di FBS, trattate con suPAR 10^{-8} M per 2, 5 e 20 minuti per valutare il suo effetto tempo-dipendente, e con suPAR 10^{-10} - 10^{-9} - 10^{-8} M per 5 minuti per accertare la dose-dipendenza.

Immunofluorescenza per uPAR ed Actina

Le cellule DU145 e PC3 sono state tripsinizzate e seminate in multiwell da 24 pozzetti, su vetrini da 10 mm pretrattati con polilisina 1X (10.000 cellule/pozzetto in 500µl di RPMI 1640, addizionato del 5% di FBS). La localizzazione di uPAR è stata valutata mediante l'utilizzo di un anticorpo policlonale anti-uPAR. Le cellule sono state fissate con 4% paraformaldeide/2% saccarosio, lavate in tampone PBS, permeabilizzate con 0,1% Triton X-100 e, infine, incubate con anticorpo primario anti-uPAR (1:50; FL-290, Santa Cruz, CA), in presenza di blocking serum. Dopo i lavaggi, le cellule sono state incubate con l'anticorpo secondario anti-rabbit verde Alexa Fluor[®] 488 (1:2000; Molecular Probes, Eugene, OR).

Per l'analisi dell'actina, poichè la falloidina lega strettamente le subunità polimerizzate di actina ma non i suoi monomeri, sono stati condotti studi di fluorescenza in cui la quantità di falloidina legata riflette la quantità di filamenti actinici. Le cellule sono state incubate con falloidina rossa TRITC 594 (1:1000, SIGMA, St.Luis, USA), per 10 minuti ed a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi con PBS, i vetrini sono stati fissati con Mowiol (Mowiol[®] 4-88 CALBIOCHEM). Le immagini sono state ottenute usando un microscopio confocale Bio-Rad MRC-1024 (Carl Zeiss, Thorn Wood, NY, USA).

Immunofluorescenza doppia per uPAR ed EGFR

La colocalizzazione di uPAR con EGFR nelle cellule DU145 è stata studiata per mezzo di immunofluorescenza doppia, utilizzando anticorpi policlonali. Le cellule della linea DU145 sono state tripsinizzate e seminate in multiwell da 24 pozzetti su vetrini da 10mm pretrattati con polilisina (15.000 cellule/500µl di RPMI addizionato del 5% di FBS). Le cellule sono state fissate in una soluzione contenente paraformaldeide al 4% e saccarosio al 2% per 5 minuti. Successivamente si è eseguito

il bloccaggio dei siti non specifici usando 10% di goat serum per 1 ora. Le cellule sono state poi incubate con l'anticorpo policlonale anti uPAR (1:50, FL-290, Santa Cruz, CA) 1 ora a temperatura ambiente, lavate in PBS e poi esposte all'anticorpo secondario anti rabbit FITC coniugato (Alexa-488, 1:2000, Molecular Probes Eugene, OR) per 1 ora. I vetrini sono stati poi esposti over night al 10% di horse serum. Successivamente le cellule DU145 sono state incubate con l'anticorpo policlonale anti-EGFR (1:100, 1005, Santa Cruz, CA) per 1 ora a temperatura ambiente. La visualizzazione di EGFR è stata ottenuta usando l'anticorpo secondario anti goat TRITC-coniugato (Alexa-594, 1:2000 Molecular Probes Eugene, OR). In seguito i vetrini sono stati fissati in Mowiol (Mowiol 488[®] Calbiocem). Gli anticorpi primari sono stati omessi nei controlli negativi ed è inoltre stata verificata l'assenza di cross-reattività tra l'anticorpo primario e l'anticorpo secondario non corrispondente. Le immagini dei vetrini sono state ottenute usando un microscopio confocale Biorad MRC-1024.

Studi di Aptotassi indotti da Laminina

Per valutare l'effetto dei diversi trattamenti sulla capacità migratoria delle cellule sono stati effettuati studi di aptotassi utilizzando la camera di Boyden.

La camera è costruita in materiale acrilico, e si possono distinguere tre diverse parti. La parte inferiore presenta 48 pozzetti chiusi sul fondo, che vengono riempiti con 28µl di fattore chemiotattico. Per i nostri esperimenti si è scelto di usare come fattore aptotattico la laminina (0,2mg/ml in tampone PBS). La porzione intermedia è costituita da una membrana porosa in policarbonato, i cui pori hanno un diametro di 8µm (Biomap). La membrana è stata coattata nella porzione inferiore con laminina. È stato poi posizionato un distanziatore in silicone dotato di 48 pozzetti, che permette la tenuta tra le varie parti della camera. La porzione superiore, di materiale acrilico, presenta 48 pozzetti aperti sul fondo e a diretto contatto con la membrana che vengono poi riempiti con 50µl della sospensione cellulare. Dopo aver opportunamente assemblato la camera si procede lasciandola in incubatore a 37°C con atmosfera modificata ed in presenza del 5% di CO₂, per 4 ore (tempo necessario alla migrazione delle cellule DU145 e PC3). Al termine dell'incubazione la camera è stata smontata e la membrana, prelevata delicatamente, è stata lavata in tampone fosfato PBS senza

calcio e magnesio (Dulbecco's). Le cellule rimaste nella parte sovrastante della membrana, relative ai pozzetti della porzione superiore della camera, rappresentano le cellule non migrate e quindi sono state eliminate mediante raschiatura. A questo punto, le cellule adese alla parte inferiore della membrana che rappresentano le cellule effettivamente migrate, sono state fissate in metanolo e successivamente colorate mediante l'ausilio del Kit Diff-QuickR (Biomap Italia). La membrana è stata quindi lavata in acqua milliQ ed adagiata su un vetrino da istologia; mediante un microscopio ad immersione sono stati contati i nuclei colorati delle cellule. I dati ottenuti sono stati poi analizzati secondo il test di Dunnet (Dunnet, 1955) dopo analisi della varianza ad una via.

Trattamenti con gli analoghi del GnRH

Le cellule DU145 e PC3, pretrattate e non per 6 giorni con GnRH-A (10^{-6} M) o GnRH-ANT (10^{-6} M), sono state seminate nei pozzetti della camera di Boyden alla densità di 75'000 cellule/50 μ l di medium RPMI 1640 senza FBS.

Trattamenti con il suPAR umano ricombinante

Le cellule DU145, pretrattate e non con suPAR 10^{-8} M per 48 ore, sono state seminate alla densità di 75.000 cellule/50 μ l di medium RPMI 1640, senza FBS.

Test di invasività

Per valutare l'effetto dei diversi trattamenti sulla capacità invasiva delle cellule è stato effettuato un test di invasività. Tale analisi è stata condotta usando una multiwell da 24 pozzetti con 12 camere d'invasione. Ciascuna di esse contiene una membrana con pori da 8 μ m ed un sottile strato di MatrigelTM. Il MatrigelTM è una preparazione che mima la matrice extracellulare presente in vivo e perciò contiene gli stessi componenti come laminina, collagene di tipo IV, proteoglicani e fattori di crescita tra cui TGF β . Lo strato di MatrigelTM ha la funzione di occludere i pori della membrana bloccando la migrazione delle cellule non invasive attraverso la membrana stessa. Al contrario, le cellule invasive (maligne e non maligne) sono in grado di attraversare lo strato di MatrigelTM e la membrana.

Per effettuare questo tipo di analisi, si prepara la camera di invasione togliendo la multiwell dal refrigeratore e portandola da -20°C a temperatura ambiente. In

seguito si aggiungono 500µl di RPMI privo di FBS ed a 37°C sul fondo di ciascuna camera di invasione e si mantiene la multiwell per 2 ore in incubatore con atmosfera umidificata, a 37°C e al 5% di CO₂ per permettere la loro reidratazione. Successivamente si rimuove con cura, senza rovinare lo strato di MatrigelTM, il medium e si procede all'analisi aggiungendo al di sotto di ogni camera 500µl di RPMI addizionato del 5% di FBS, mentre all'interno di ogni camera di invasione sono state seminate le cellule in sospensione. Le camere d'invasione sono state incubate per 22 ore in atmosfera umidificata, a 37°C e al 5% di CO₂. Al termine dell'incubazione le cellule non invasive sono state rimosse dalla parte superiore della membrana, mentre quelle migrate sono state fissate in metanolo, colorate con eosina e blu di tiazina, e contate con microscopio ad immersione.

Trattamenti con gli analoghi del GnRH

Le cellule DU145 e PC3, pretrattate e non per 6 giorni con GnRH-A (10⁻⁶M) o GnRH-ANT (10⁻⁶M), sono state seminate alla densità di 75.000 cellule/500µl di medium RPMI 1640 privo di FBS.

Trattamenti con il suPAR umano ricombinante

Le cellule DU145, pretrattate e non con suPAR 10⁻⁸M per 48 ore, sono state seminate alla densità di 75.000 cellule/500µl di medium RPMI 1640 privo di FBS.

RISULTATI

Effetto del trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT sulla proliferazione delle cellule DU145 e PC3

Nelle Figure 5 e 6 viene mostrato l'effetto del trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT sulla proliferazione delle cellule di CaP androgeno-indipendente DU145 (Figura 5) e PC3 (Figura 6).

Le cellule sono state trattate, a giorni alterni, per una durata totale di 6 giorni con dosi scalari (10^{-10} - 10^{-6} M) di GnRH-A o GnRH-ANT. Al termine del trattamento, le cellule sono state raccolte e contate con emocitometro. L'analisi statistica dei dati ottenuti dimostra come sia il trattamento con GnRH-A che il trattamento con GnRH-ANT inibiscono, in modo significativo alla dose 10^{-8} e 10^{-6} M la proliferazione sia delle cellule DU145 che delle cellule PC3.

Effetto del trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT sull'attività enzimatica degli Attivatori del Plasminogeno

Nella Figura 7 viene mostrato l'effetto del trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT sull'attività enzimatica totale degli attivatori del plasminogeno (PA), misurata nel mezzo condizionato delle cellule DU145 e PC3. Il PA totale è stato misurato attraverso un saggio cromogenico per la plasmina che utilizza S2251 come substrato.

Dalla Figura 7 appare chiaro che la quantità di PA secreto nel mezzo condizionato delle cellule PC3 risulta significativamente più elevata rispetto a quella riportata nelle cellule DU145. Inoltre, il PA totale secreto nel mezzo di coltura delle cellule DU145 e PC3 trattate con GnRH-A e GnRH-ANT risulta inferiore rispetto a quella rilevata nelle cellule di controllo non trattate.

L'effetto inibitorio del GnRH-A sulla secrezione di PA è significativo alla dose di 10^{-6} M nelle cellule DU145, e per le dosi 10^{-8} e 10^{-6} M nelle cellule PC3; in modo simile l'antagonista del GnRH inibisce in modo significativo, sia alla dose di 10^{-8} che di 10^{-6} M, il PA secreto da entrambe le cellule di CaP androgeno-indipendente.

Effetto del trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT sull'espressione di uPA nelle cellule DU145 e PC3

Dopo aver valutato l'effetto di GnRH-A e GnRH-ANT sulla liberazione di PA totale, abbiamo analizzato, grazie ad un dosaggio immunoenzimatico, l'effetto di agonisti ed antagonisti del GnRH sull'uPA secreto nel mezzo di coltura delle cellule DU145 e PC3 trattate per 8 e 24 ore con GnRH-A e GnRH-ANT (10^{-8} - 10^{-6} M).

Dalle Figure 8 e 9 risulta evidente che la secrezione di uPA da parte delle cellule PC3 non trattate risulta essere significativamente più elevata rispetto a quella misurata nelle cellule DU145 di controllo. Inoltre appare chiaro che il trattamento con GnRH-A induce una inibizione della secrezione di uPA sia nelle cellule DU145 che PC3. Tale inibizione è significativa per la dose di 10^{-6} M, sia per il trattamento di 8 ore che 24 ore, per entrambe le linee cellulari. Nelle cellule PC3 l'uPA secreto dopo 24 ore di trattamento sia con la dose di 10^{-8} M che di 10^{-6} M di GnRH-A risulta essere significativamente più basso. Anche l'antagonista GnRH-ANT inibisce, in modo significativo, l'uPA secreto sia dalle cellule DU145 (alla dose di 10^{-6} M) sia quello prodotto dalle PC3 (alle dosi 10^{-8} e 10^{-6} M) dopo un trattamento di 8 ore. L'effetto inibitorio del GnRH-ANT sull'uPA secreto viene mantenuto dopo un trattamento di 24 ore e risulta significativo per le dosi di 10^{-8} e 10^{-6} M sulle cellule DU145 e per la dose di 10^{-6} M sulle cellule PC3.

Effetto del trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT sull'espressione di uPA e PAI-1

L'analisi zimografica dell'uPA secreto nel mezzo condizionato delle cellule DU145 e PC3 trattate e non con GnRH-A e GnRH-ANT (10^{-8} - 10^{-6} M) è stata effettuata mediante un gel di poliacrilamide-SDS co-polimerizzato con caseina, in presenza di plasminogeno. Le bande di attività enzimatica, situate ad un'altezza del gel corrispondente ad un peso molecolare di 50-52 kDa, appaiono come bande bianche su uno sfondo scuro di caseina colorata non degradata. L'analisi zimografica dell'uPA è stata effettuata dopo 8 e 24 ore di trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT.

Come è visibile nelle Figure 10 e 11, la proteolisi associata all'espressione di uPA risulta essere ridotta sia dopo 8 che dopo 24 ore di trattamento, sia con l'agonista che con l'antagonista nelle cellule DU145, mentre nelle cellule PC3 la riduzione

risulta essere particolarmente evidente soprattutto dopo 24 ore di trattamento, sia con GnRH-A che GnRH-ANT.

Nelle stesse Figure 10 e 11 sono riportati anche i livelli dell'inibitore PAI-1 dopo il trattamento con l'agonista e l'antagonista. Sia per le cellule DU145 che per le cellule PC3, ad entrambi i tempi di osservazione (8 e 24 ore), l'espressione di PAI-1 secreto nel mezzo condizionato dalle cellule non trattate risulta essere particolarmente bassa. Il trattamento di 8 e 24 ore, sia con GnRH-A che con GnRH-ANT, aumenta in modo rilevante l'inibitore PAI-1 secreto sia dalle cellule DU145 che PC3.

Effetto del trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT sulla capacità migratoria ed invasiva di cellule DU145 e PC3

Per valutare l'effetto di trattamenti con gli analoghi del GnRH sulla capacità migratoria delle cellule di CaP umano DU145 e PC3 sono poi stati condotti studi di aptotassi indotta da laminina in camera di Boyden. Tale metodica permette di valutare la capacità migratoria delle cellule che attraversano una membrana porosa e migrano verso un fattore aptotattico posto al di là della membrana stessa.

I dati ottenuti hanno permesso di confrontare la capacità migratoria delle cellule DU145 e PC3 pretrattate per 6 giorni con GnRH-A (10^{-6} M) o GnRH-ANT (10^{-6} M), rispetto alla migrazione delle cellule non trattate. I risultati ottenuti hanno permesso di stabilire che il trattamento con gli analoghi del GnRH diminuisce, in modo significativo, l'attività migratoria delle cellule DU145 e PC3 (Figura 12, pannello A) rispetto ai controlli non trattati.

Grazie a studi di invasione in MatrigelTM sono stati poi valutati gli effetti degli analoghi del GnRH sulla capacità invasiva delle cellule di CaP umano DU145 e PC3. Tali studi si sono avvalsi dell'uso di camere d'invasione ciascuna contenente una membrana con pori da 8µm rivestita, nel lato interno, di un sottile strato di MatrigelTM su cui sono state seminate le cellule DU145 e PC3 pretrattate con gli analoghi del GnRH. Con questo metodo è possibile valutare la capacità invasiva delle cellule DU145 e PC3 che, muovendosi attraverso la barriera del MatrigelTM fuoriescono dai pori della membrana della camera per ancorarsi nella porzione inferiore della camera dove, dopo fissazione e colorazione, possono venire contate. Dai risultati del test d'invasione riportati nella Figura 12, pannello B è possibile evidenziare che le cellule

DU145 e PC3 trattate con GnRH-A (10^{-6} M) e con GnRH-ANT (10^{-6} M) mostrano un'evidente e significativa diminuzione della capacità invasiva della matrice di MatrigelTM rispetto alle cellule di controllo non trattate.

Espressione di uPAR in cellule DU145 e PC3

La Figura 13 mostra la distribuzione di uPAR e di actina nelle cellule di CaP umano androgeno indipendente DU145. Mediante tecniche di immunofluorescenza è stato possibile evidenziare come l'uPAR abbia un'elevata espressione intracitoplasmatica oltre ad essere diffuso su tutta la superficie della cellula (pannello A). Nel pannello B si può distinguere la disposizione dell'actina maggiormente addensata nella porzione al di sotto della membrana plasmatica.

I pannelli C e D mostrano la localizzazione di uPAR rispetto alla distribuzione delle fibre actiniche. In particolare, nel pannello D è evidenziata la colocalizzazione di uPAR con i filamenti di actina in alcuni domini citoplasmatici.

In Figura 14 è riportata la distribuzione di uPAR nelle cellule di tumore prostatico umano androgeno indipendente PC3. Anche in questo caso l'uPAR risulta estremamente espresso a livello intracitoplasmatico, oltre ad essere diffuso su tutta la superficie cellulare. La fluorescenza con falloidina mette in evidenza la disposizione di actina organizzata ad anello al di sotto della membrana plasmatica, con la presenza di lamellipodi e filipodi (pannello B). Anche per le cellule PC3, come riportato dal pannello C, si evidenzia l'ampia distribuzione di uPAR rispetto alla componente actinica; nel pannello D è riportata la colocalizzazione fra actina ed uPAR, risultante da un'analisi computerizzata che mostra la sovrapposizione della maschera di colocalizzazione applicata al merge in alcuni domini cellulari

Effetto del trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT sull'espressione di uPAR in cellule DU145 e PC3

In seguito al trattamento con gli analoghi del GnRH, le cellule di tumore prostatico androgeno indipendenti DU145 e PC3 ed i loro surnatanti sono stati raccolti e sottoposti a studi Western Blotting per evidenziare l'espressione del recettore per l'uPA. La Figura 15 mostra l'espressione di uPAR negli estratti cellulari e la presenza della forma solubile dell'uPAR (suPAR) nei surnatanti di queste cellule. Dai risultati

riportati nella Figura 15 appare evidente che, mentre il trattamento con GnRH-A (10^{-8} - 10^{-6} M) e GnRH-ANT (10^{-8} - 10^{-6} M) non sembra alterare l'espressione di uPAR nei lisati cellulari, nel surnatante delle cellule DU145 e PC3 è presente una banda di 55-60kDa riferibile alla porzione solubile di uPAR; tale banda è completamente assente nei surnatanti delle cellule DU145 e PC3 di controllo non trattate.

Colocalizzazione di uPAR ed EGFR in cellule DU145

Poiché è noto che il controllo delle capacità invasive di cellule di CaP è direttamente correlato all'espressione ed all'attività di uPAR ed EGFR sono stati condotti studi di colocalizzazione di uPAR ed EGFR in uno dei modelli cellulari di CaP androgeno-indipendente, le cellule DU145. Mediante una tecnica di immunofluorescenza doppia, analizzata con microscopio confocale, è stato possibile verificare che le cellule DU145 esprimono una elevata concentrazione di uPAR (Figura 16). Tale espressione, evidenziata da immunofluorescenza verde, risulta essere particolarmente presente sia nella zona periferica del cortex cellulare, che a livello intracitoplasmatico (pannello A).

Il pannello B della Figura 16 riporta la distribuzione di EGFR nelle cellule DU145 evidenziata come immunofluorescenza rossa. Come già riportato da altri studi effettuati su varie linee di CaP androgeno-indipendenti, l'espressione dell'EGFR risulta particolarmente elevata. I pannelli C e D mostrano la colocalizzazione di uPAR ed EGFR evidenziata dalla sovrapposizione dell'immunofluorescenza verde (uPAR) con quella rossa (EGFR). In particolare il pannello D evidenzia la colocalizzazione di uPAR con il recettore per EGF risultante da un'analisi computerizzata che mostra la sovrapposizione della maschera di colocalizzazione applicata al merge in alcuni domini cellulari.

Effetto del trattamento cronico con GnRH-A e GnRH-ANT sull'espressione di P-EGFR/EGFR in cellule DU145

Per valutare se gli analoghi del GnRH sono in grado di influenzare la fosforilazione del recettore per l'EGF sono stati condotti degli studi di Western Blotting. Dai risultati ottenuti riportati in Figura 17 appare evidente che il trattamento di 6 giorni sia con GnRH-A (10^{-8} - 10^{-6} M) che con GnRH-ANT è in grado di diminuire

in maniera evidente la fosforilazione del recettore per l'EGF, come mostrato dalla riduzione della banda dell'EGFR fosforilato a 170 kDa. Non sembra invece che i trattamenti con gli analoghi del GnRH alterino l'espressione del recettore EGFR in cellule DU145. La Figura 17 mostra la tipica banda a 170 kDa di EGFR che non sembra essere significativamente variata nei lisati di cellule di controllo e di cellule trattate sia con GnRH-A che con GnRH-ANT.

Effetto del trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT sull'espressione di P-EGFR, EGFR, P-ERK1/2 ed ERK1/2 in cellule DU145

Dopo aver osservato un'inibizione della fosforilazione di EGFR a seguito di trattamenti a lungo termine (6 giorni) con analoghi del GnRH, si è analizzato l'effetto di trattamenti a breve termine con analoghi del GnRH sia sul recettore per EGF che sulla via di trasduzione del segnale delle MAPK osservando l'intermedio P-ERK-ERK1/2. A tale scopo le cellule sono state trattate per tempi diversi con GnRH-A (10^{-6} M) o GnRH-ANT (10^{-6} M) ed al termine del trattamento sono state raccolte e sugli estratti cellulari ottenuti sono state eseguite analisi Western Blotting. La Figura 18 mostra l'effetto dei trattamenti a tempi brevi (10min e 40min) con GnRH-A sull'espressione di P-EGFR, EGFR, P-ERK1/2 ed ERK1/2. Dai risultati ottenuti riportati nella Figura 18 appare evidente una riduzione della fosforilazione del recettore per EGF nelle cellule DU145 trattate rispetto a controlli non trattati; inoltre è possibile osservare come la fosforilazione di ERK, parzialmente indotta dopo 10 min, venga ridotta in maniera significativa 40 minuti dopo il trattamento con GnRH-A. Lo stesso tipo di andamento è stato evidenziato quando le cellule DU145 sono state trattate con GnRH-ANT. Dalla Figura 19 appare evidente che il trattamento di 10min con il GnRH-ANT induce una riduzione della fosforilazione di EGFR ed un aumento evidente dell'espressione della forma fosforilata di ERK. Dopo 40 minuti di trattamento con l'antagonista la fosforilazione di EGFR risultata ancora ridotta, tuttavia si riduce in maniera significativa anche la fosforilazione di ERK.

Effetto del trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT sull'espressione di P-ERK1/2 ed ERK1/2 in presenza o assenza dell'inibitore PD98059 in cellule DU145

Abbiamo poi voluto studiare se l'attivazione di P-ERK a seguito del trattamento con gli analoghi del GnRH fosse specifica. Abbiamo quindi valutato l'effetto del trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT sulla fosforilazione di ERK1/2 in presenza e assenza del suo inibitore specifico PD98059. Le cellule DU145 sono state pretrattate per 1 ora con PD98059 (10^{-5} M) e quindi trattate per 10 minuti con GnRH-A (10^{-6} M) e GnRH-ANT (10^{-6} M), mentre le cellule di controllo sono state trattate con il solo veicolo DMSO (0.01%). I livelli di P-ERK1/2 e ERK1/2 sono stati analizzati tramite analisi Western Blotting. In Figura 20 è possibile osservare che entrambe gli analoghi del GnRH inducono, dopo 10 minuti l'attivazione della fosforilazione di ERK; tale effetto risulta completamente abolito dal pretrattamento delle cellule DU145 con il PD98059, inibitore specifico di ERK1/2.

Effetto del suPAR sulla proliferazione e sull'incorporazione di [3 H] Timidina delle cellule DU145

E' stato poi studiato l'effetto del trattamento col suPAR ricombinante umano (10^{-9} - 10^{-8} M) sulla proliferazione delle cellule DU145. Cellule DU145 trattate e non per 48 ore con il di suPAR sono state raccolte e contate con emocitometro. Dai risultati mostrati in Figura 21, pannello A, si evince che il trattamento con suPAR determina una riduzione significativa della proliferazione delle cellule DU145 rispetto a cellule controllo non trattate. L'effetto antiproliferativo del suPAR sulle cellule DU145 diventa significativo alla concentrazione di 10^{-8} M. E' stato poi studiato l'effetto del trattamento con suPAR sull'incorporazione di timidina radiomarcata con trizio [3 H] in cellule di CaP androgeno-indipendente DU145.

Le cellule, seminate in multiwell da 24 pozzetti, sono state trattate per 48 ore con dosi scalari di suPAR ricombinante umano (10^{-9} - 10^{-8} M); nelle ultime 6 ore di trattamento, è stata aggiunta la soluzione di timidina alla concentrazione di 1.0mCi/ml.

I risultati, mostrati in Figura 21, pannello B dimostrano che il trattamento con suPAR induce una riduzione dell'incorporazione di [^3H] timidina in cellule DU145; tale effetto diventa significativo alla dose di suPAR di 10^{-8}M .

Effetto del trattamento con suPAR sul ciclo cellulare di cellule DU145 analisi FACScan

A seguito dell'osservazione che il trattamento con il suPAR induce nelle cellule di CaP androgeno-indipendente DU145 un'inibizione della proliferazione e dell'incorporazione di [^3H] timidina, abbiamo voluto indagare se, nelle cellule trattate con suPAR, si verificavano alterazioni del ciclo cellulare. Sono state condotte analisi FACScan volte sia a quantificare il numero delle cellule DU145 presenti in ogni singola fase del ciclo cellulare che a valutare la percentuale di cellule in apoptosi. Nella Figura 22 è possibile notare che il trattamento con suPAR induce una riduzione della popolazione di cellule in fase G_0/G_1 (dal 71.33% delle cellule di controllo non trattate, al 66.19% delle cellule trattate), accompagnata da un aumento delle cellule in fase G_2/M (dal 13.59% delle cellule di controllo non trattate, al 18.94% delle cellule trattate), mentre la popolazione di cellule in fase S risulta essenzialmente invariata. Inoltre l'effetto del trattamento di 24 ore con suPAR (10^{-8}M) induce un aumento dell'apoptosi: dal 2% delle cellule di controllo non trattate, al 18% delle cellule DU145 trattate con suPAR.

Modulazione dell'espressione di P-ERK/ERK1/2 in cellule DU145 indotta dal suPAR

Poiché è noto che la via di trasduzione del segnale uPAR-dipendente prevede l'attivazione di vari sistemi, tra cui quello del sistema di chinasi EGFR-ERK, si è voluto analizzare, mediante studi di Western Blotting, l'effetto di trattamenti col suPAR sulla via di trasduzione del segnale delle MAPK, ponendo l'attenzione sull'intermedio ERK 1/2.

In Figura 23, pannello A, vengono mostrati gli effetti del trattamento di cellule DU145 col suPAR (10^{-8}M) per 2, 5 e 20 minuti, sull'espressione e sulla fosforilazione di ERK1/2.

Dai risultati ottenuti, appare interessante evidenziare che le cellule DU145 non trattate esprimono apprezzabili livelli di ERK1/2 fosforilato. Il trattamento con la molecola suPAR ricombinante induce, dopo 2 minuti, l'inibizione della fosforilazione di ERK1/2; tale inibizione risulta più marcata dopo 5 minuti di trattamento, mentre, a 20 minuti, l'inibizione risulta meno evidente.

Per valutare se l'effetto fosse specifico e dose-dipendente, sono stati poi condotti studi in cui le cellule DU145 venivano trattate per 5 minuti con tre diverse concentrazioni di suPAR (10^{-10} - 10^{-9} - 10^{-8} M). I risultati evidenziano un effetto inibitorio dose-dipendente della fosforilazione di ERK che si manifesta all'aumentare della concentrazione del suPAR (Figura 23, pannello B). I dati rappresentati in Figura 23 sono stati normalizzati rispetto all'espressione di ERK totale costitutivo presente nelle cellule DU145.

Effetto del trattamento con suPAR e CsuPAR sull'espressione di P-ERK/ERK1/2 in cellule DU145

La Figura 24 mostra l'effetto del trattamento con suPAR e CsuPAR sulla fosforilazione di ERK1/2 in cellule DU145. Il CsuPAR è stato preparato incubando il suPAR (10^{-8} M) con la chimotripsina ($5\mu\text{g/mL}$) per 7 ore a 37°C . Le cellule DU145 sono state trattate e non con suPAR (10^{-8} M) e CsuPAR per 5 minuti. I lisati cellulari sono stati sottoposti ad analisi Western Blotting per determinare l'espressione di P-ERK1/2 ed ERK1/2 totale. Dai risultati ottenuti è possibile osservare ancora una volta che il suPAR è in grado di inibire la fosforilazione di ERK1/2, mentre, tagliando la molecola del suPAR con la chimotripsina, il frammento ottenuto, il CsuPAR, non è più in grado di inibire l'attivazione di ERK.

Effetto del trattamento con suPAR sulla capacità migratoria ed invasiva di cellule DU145

Per valutare l'effetto del suPAR sulla migrazione delle cellule DU145, sono stati condotti studi di aptotassi indotta da laminina in camera di Boyden. Tale strumento consente di valutare la capacità migratoria delle cellule attraverso una membrana porosa verso un fattore aptotattico (la laminina) posto al di là della membrana stessa.

Le cellule DU145 sono state trattate per 48 ore col suPAR (10^{-8}M); al termine del trattamento, le cellule sono state raccolte e seminate nella camera di Boyden. Dopo 4 ore, le cellule migrate sono state fissate, colorate e contate ed i dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica.

Dai risultati ottenuti, mostrati in Figura 25, pannello A, si è potuto verificare che il suPAR induce una significativa riduzione del numero di cellule DU145 migrate attraverso la membrana della camera di Boyden rispetto a cellule controllo non trattate.

L'effetto del trattamento con suPAR è stato studiato anche sulla capacità delle cellule di CaP androgeno-indipendente DU145 d'invadere una matrice extracellulare sintetica come il MatrigelTM. Questi esperimenti sono stati eseguiti in camere d'invasione, contenenti ciascuna una membrana con pori da $8\mu\text{m}$ rivestita, sul lato interno, da un sottile strato di MatrigelTM su cui sono state seminate le cellule DU145 pretrattate per 48 ore con suPAR.

La capacità invasiva viene valutata come numero di cellule che, muovendosi attraverso la barriera del MatrigelTM, fuoriescono dai pori della membrana della camera per, poi, ancorarsi alla porzione inferiore di essa; qui, le cellule vengono fissate, colorate ed i dati ottenuti sono sottoposti ad analisi statistica.

L'esito del test di invasione, riportato in Figura 25, pannello B, mostra l'evidente e significativa inibizione della capacità invasiva delle cellule DU145 trattate con suPAR (10^{-8}M) per 48 ore rispetto alle cellule non trattate.

DISCUSSIONE

Il tumore prostatico umano (CaP) è una patologia molto diffusa, le cui prime fasi di sviluppo dipendono dalla presenza degli androgeni (Meikle et al., 1987; Geller & Vik Franson, 1989).

Il trattamento terapeutico del tumore allo stadio iniziale prevede l'eliminazione degli androgeni circolanti grazie all'impiego sia di anti-androgeni che di farmaci agonisti del GnRH; il meccanismo di azione di questi ultimi farmaci implica il blocco dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, con conseguente riduzione della produzione di testosterone. Attualmente, la terapia con agonisti del GnRH rappresenta il trattamento d'elezione per pazienti affetti da cancro prostatico in fase avanzata e, nel 70% dei casi, questi farmaci, da soli o con anti-androgeni, sono scelti come trattamento primario (Schally & Comaru-Schally, 2000).

Studi eseguiti negli ultimi anni hanno evidenziato che il CaP, come altri tumori di natura endocrina, come il cancro alla mammella, all'endometrio esprimono recettori per il GnRH; l'attivazione di tali recettori con analoghi del GnRH induce un'inibizione significativa della proliferazione delle cellule tumorali. In particolare è stato dimostrato che gli analoghi del GnRH inducono un'inibizione della proliferazione sia su cellule di CaP androgeno-dipendenti che androgeno-indipendenti (Dondi et al., 1994; Jungwirth et al., 1997).

Oltre agli agonisti, sono attualmente disponibili anche antagonisti del GnRH; tali farmaci sono utilizzati in trials clinici per il trattamento di pazienti affetti da CaP in quanto gli antagonisti inducono il blocco dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi che porta all'inibizione della secrezione di testosterone senza indurre l'iniziale azione stimolatoria (fenomeno del flare-up) tipica degli agonisti del GnRH.

Diversi sono i farmaci antagonisti del GnRH di ultima generazione impiegati attualmente in trials clinici di fase I e II per il trattamento di pazienti affetti da CaP (Schally & Comaru-Schally, 2000) ed i risultati sembrano essere confortanti. Inoltre anche gli antagonisti del GnRH come il Cetrorelix, sono in grado di esercitare un effetto anti-proliferativo sulle cellule di CaP sia androgeno-dipendenti che androgeno-indipendenti (Dondi et al., 1994; Limonta et al., 2001, 2003) oltre che su altre cellule

tumoriali di mammella (Miller et al., 1995; Keri et al., 1991), endometrio (Emons et al., 1996), ovaio (Emons et al., 2000).

La progressione del CaP umano è caratterizzata dall'acquisizione di un comportamento altamente invasivo e metastatico, e la conoscenza dei meccanismi che contribuiscono a questi processi è di grande importanza sia per ragioni diagnostiche che terapeutiche.

Nel carcinoma prostatico, il potenziale invasivo delle cellule tumorali è correlato sia con l'attività proteolitica associata alla cellula tumorale stessa, che porta alla degradazione della ECM e della membrana basale, che alla capacità migratoria. In particolare, il sistema attivatore del plasminogeno e il sistema delle metalloproteasi sono coinvolti in questi processi che favoriscono lo sviluppo del tumore (Festuccia et al., 1998).

Nella prima parte di questa tesi è stato studiato l'effetto di agonisti ed antagonisti del GnRH sia sull'espressione e sull'attività del sistema serino-proteasico attivatore del plasminogeno che sulla capacità migratoria ed invasiva delle cellule DU145, ottenute da una metastasi cerebrale di CaP androgeno-indipendente, e PC3, derivate da una metastasi ossea di CaP androgeno-indipendente.

In una prima serie di esperimenti si è valutato se l'agonista Leuprolina acetato (GnRH-A) e l'antagonista Cetrorelix (GnRH-ANT), oltre ad inibire la proliferazione delle cellule di CaP umano androgeno-indipendenti DU145 e PC3, fossero anche in grado di modulare l'attività enzimatica e i livelli proteici di uPA e del suo inibitore PAI-1.

I risultati riportati in questa tesi dimostrano chiaramente che sia l'agonista GnRH-A che l'antagonista GnRH-ANT sono in grado di ridurre significativamente ed in maniera dose-dipendente la proliferazione delle cellule DU145 e PC3.

Sembra, pertanto, che a livello delle cellule di CaP DU145 e PC3, l'antagonista GnRH-ANT, che a livello ipofisario esercita la propria azione antagonista bloccando il recettore per il GnRH, agisca come l'agonista GnRH-A nell'inibire la proliferazione delle cellule di CaP; tale effetto è già riportato in letteratura sia per il CaP (Limonta et al., 2001, 2003; Emons et al., 1997; Gründker et al., 2002) che per altri modelli cellulari di cancro umano. In particolare, mentre Jungwirth et al. (1997) hanno verificato la riduzione dei livelli circolanti di LH e testosterone in seguito a trattamenti

con il Cetrorelix in cellule DU145 xenotrapiantate in topi nudi, Emons et al. (1997) hanno riportato che l'antagonista Cetrorelix esercita una marcata azione anti-proliferativa su cellule di tumore umano ovarico, endometriale ed alla mammella. Yano et al. (1994) hanno studiato l'effetto dell'agonista Triptorelina e dell'antagonista Cetrorelix sulla linea cellulare umana di tumore ovarico OV-1063 xenotrapiantata in topi nudi. Questi autori hanno dimostrato una significativa inibizione della crescita tumorale in seguito a trattamento cronico con il Cetrorelix, mentre il trattamento con la Triptorelina non produce alcun effetto. Poiché entrambi gli analoghi sono in grado di bloccare l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi in modo equivalente, gli autori ipotizzano che la differenza tra gli effetti della Triptorelina e quelli del Cetrorelix possa essere spiegata in base al fatto che solo l'antagonista del GnRH sarebbe in grado di esercitare un effetto antitumorale a livello del tessuto tumorale.

Ravenna et al. (2000) riportano invece dati secondo cui sia l'agonista Triptorelina che l'antagonista Cetrorelix sarebbero in grado di inibire la proliferazione delle cellule di CaP androgeno-dipendenti LNCaP ma solo l'antagonista del GnRH sarebbe in grado di inibire la proliferazione delle cellule androgeno-indipendenti PC3; questi differenti risultati potrebbero essere legati a differenze di colture e/o trattamenti con gli analoghi del GnRH a cui le cellule di CaP sono state sottoposte rispetto alle nostre condizioni sperimentali.

Nei nostri esperimenti, sia GnRH-A (Leuprolina acetato) che GnRH-ANT (Cetrorelix) hanno dimostrato un effetto inibitorio sulla proliferazione delle cellule di CaP androgeno-indipendenti DU145 e PC3.

Il fatto che il GnRH-ANT Cetrorelix, che è un antagonista dell'ormone a livello ipofisario, induca, secondo noi ed altri laboratori, un effetto anti-proliferativo sulla crescita tumorale, può sembrare piuttosto strano. Ancora oggi, la ragione per cui il Cetrorelix agisce da antagonista a livello delle gonadotrope e da agonista a livello delle cellule tumorali non è chiara. È, tuttavia, lecito supporre che possano esistere delle differenze molecolari fra il GnRH-r ipofisario e quello presente a livello del tessuto tumorale.

Alcuni autori sostengono anche la possibilità che il Cetrorelix possa agire in seguito all'attivazione di un diverso GnRH-r, per esempio, un recettore GnRH-r di tipo II che, però, ad oggi, non è ancora stato evidenziato a livello del tessuto tumorale

prostatico. Tale ipotesi risulta avvalorata da studi secondo cui gli antagonisti per il GnRH-r di tipo I possono agire come farmaci agonisti per il recettore di tipo II (Sun et al., 2001; Gründker et al., 2002). Sono comunque necessari ulteriori approfondimenti per chiarire l'eventuale presenza di un recettore di tipo II per il GnRH nel tessuto tumorale prostatico.

Numerosi studi hanno da tempo dimostrato che il sistema attivatore del plasminogeno svolge un ruolo cruciale nel meccanismo di invasione e metastasi del tumore prostatico umano (Crowly et al., 1993; Achbarou et al., 1994; Rabbani et al., 1995). Le cellule di CaP variano notevolmente in termini di attività netta del sistema attivatore del plasminogeno (Heinert et al., 1988). Questa variabilità correla positivamente con la capacità invasiva *in vitro* delle cellule di CaP e con il loro potenziale metastatico *in vivo* (Lyon et al., 1995; Festuccia et al., 1995). Le due linee cellulari di CaP androgeno-indipendente DU145 e PC3 esprimono elevati livelli di uPA, mentre la linea di CaP androgeno-dipendente LNCaP non esprime livelli rilevabili di uPA (Festuccia et al., 1998).

In questa tesi sono riportati i dati relativi all'effetto del trattamento con GnRH-A o ANT sui livelli di uPA rilasciati nel mezzo di coltura di cellule di CaP androgeno-indipendenti DU145 e PC3. In una prima serie di esperimenti, si è valutato l'effetto di agonisti ed antagonisti sulla quantità di PA totale secreto nel mezzo di coltura delle cellule DU145 e PC3. Dai risultati ottenuti, appare chiaro che sia l'agonista che l'antagonista del GnRH sono in grado di diminuire, in maniera dose-dipendente, i livelli di PA totale rilasciato nel mezzo di coltura sia dalle cellule DU145 che dalle cellule PC3. Si è poi indagato quale componente del sistema attivatore del plasminogeno fosse maggiormente influenzata dal trattamento con agonisti ed antagonisti del GnRH.

I surnatanti delle cellule DU145 e PC3, trattate e non con Leuprolina acetato e Cetrorelix (10^{-8} - 10^{-6} M), per tempi diversi (8 e 24 ore) sono stati sottoposti a dosaggio immunoenzimatico specifico per l'uPA, il componente del sistema attivatore del plasminogeno prodotto in maggiore quantità dalle cellule di CaP androgeno-indipendenti. Dai risultati riportati in questa tesi, è evidente come sia l'agonista che l'antagonista del GnRH riducano in maniera significativa ad entrambe i tempi di

osservazione, la quantità di uPA rilasciata nel mezzo di coltura delle cellule DU145 che PC3, rispetto a quella rilevata nelle cellule non trattate.

Gli stessi mezzi condizionati provenienti da cellule DU145 e PC3 trattate con gli analoghi del GnRH sono stati sottoposti ad analisi Zimografica per uPA e ad analisi Western Blotting per l'inibitore PAI-1. Dai risultati riportati in questa tesi, è possibile osservare come sia il trattamento con GnRH-A che quello con GnRH-ANT inducono una diminuzione dei livelli di uPA secreto e, contemporaneamente, un aumento significativo della liberazione di PAI-1 nel mezzo condizionato di cellule di CaP DU145 e PC3.

Il coinvolgimento di uPA nella progressione del cancro prostatico è riportato da diversi autori (Miyake et al., 1999; McCabe et al., 2000). Miyake et al. (1999) hanno riportato queste osservazioni rilevando che i livelli serici di uPA e del suo recettore sono superiori nei soggetti con cancro prostatico rispetto ai soggetti sani o colpiti da BPH (iperplasia prostatica benigna) e che maggiori livelli di uPA e uPAR sono associati ad una patologia non organo confinata e ad una minore aspettativa di vita.

Più in generale, è stata dimostrata una maggiore attività degli attivatori del plasminogeno, dovuta ad uPA, nelle metastasi di tumore prostatico rispetto al tumore primario (Kirchheimer et al., 1984) ed è stato evidenziato che i livelli plasmatici di uPA sono più elevati nei pazienti con metastasi rispetto a quelli con una patologia localizzata (Pfluger et al., 1987). I nostri dati concordano con quanto riportato da altri autori secondo cui la quota di uPA, prodotta dalle cellule DU145, è minore rispetto a quella secreta dalle cellule PC3, più aggressive ed invasive (Hoosein et al., 1991).

L'interazione fra GnRH e sistema attivatore del plasminogeno è stata studiata in modelli cellulari di citotrofoblasti extravillosi e in colture primarie di cellule stromali isolate da tessuti deciduali umani provenienti dal primo trimestre di gestazione; infatti l'uPA e il suo inibitore endogeno PAI-1 sembrano rivestire un ruolo chiave negli eventi di rimodellamento che avvengono nell'endometrio in preparazione della gravidanza (Feinberg et al., 1989; Floridon et al., 1999; Schatz et al., 1999). Chou et al. (2002) sostengono che sia il GnRH I che il GnRH II sono in grado di aumentare sia l'mRNA che i livelli proteici di uPA in cellule di tessuti stromali deciduali; tuttavia, gli stessi ormoni sembrano comportarsi diversamente, in quanto il GnRH I aumenta mentre il GnRH II diminuisce i livelli di PAI-1 nelle stesse cellule. In questo sistema,

le due forme del GnRH secrete dalla placenta e dall'endometrio potrebbero agire come elementi regolatori sulle proteasi responsabili della degradazione della matrice durante la gravidanza.

Gli stessi autori sostengono anche che esposizioni prolungate al GnRH I sono in grado di inibire in modo significativo i livelli di mRNA e proteici di uPA e di PAI-1 in colture primarie di cellule stromali deciduali. In modo analogo, gli effetti inibitori del GnRH II su mRNA e livelli proteici di PAI-1 nelle stesse cellule si riducono durante esposizioni prolungate del trattamento. Tale effetto bifasico potrebbe essere attribuito ad una desensitizzazione del recettore GnRH-r in seguito a trattamenti prolungati con GnRH.

Chou et al. (2003) riportano anche che il Cetrorelix è in grado di inibire, in maniera dose-dipendente, gli effetti stimolatori del GnRH I su mRNA e livelli proteici di uPA in cellule stromali deciduali in coltura. Tuttavia, gli stessi autori riportano che nelle stesse cellule il Cetrorelix non sembra avere effetto sull'aumento di uPA (mRNA e proteine) indotto dal GnRH II. L'abilità del Cetrorelix, un antagonista ritenuto specifico per il GnRH-r I, di inibire gli effetti indotti dal GnRH I ma non quelli indotti dal GnRH II sull'uPA in cellule stromali deciduali, fornisce ulteriori evidenze che l'azione biologica di questi due ormoni possa avvenire attraverso due distinti recettori GnRH-r.

Negli esperimenti riportati in questa tesi, l'effetto inibitorio riportato su PA, uPA e l'aumento dei livelli di PAI-1 indotti in seguito a trattamento con agonisti ed antagonisti del GnRH non sembra essere legato al tempo di osservazione, in quanto sia ad 8 che a 24 ore gli analoghi del GnRH inducono sul sistema attivatore del plasminogeno risultati che sembrano andare nello stesso senso.

I nostri dati sembrano concordare anche con lo studio condotto anni fa da Hierowski e Schally (1985) che evidenziarono come l'agonista del GnRH Triptorelina, in ratti Dunning RT 3327H portatori di tumore prostatico producesse una riduzione dell'attività di PA totale rispetto ai ratti non trattati. I dati riportati in questa tesi concordano con quelli ottenuti anni fa da Hierowski e Schally e avvalorano l'ipotesi secondo cui i farmaci agonisti ed antagonisti del GnRH sono in grado di inibire, in modo significativo, l'attività dell'uPA nelle cellule di CaP androgeno-indipendenti DU145 e PC3.

Si è poi indagato se il trattamento con gli analoghi del GnRH fosse in grado di influenzare la capacità migratoria ed invasiva delle cellule DU145 e PC3. Sono stati pertanto condotti studi di aptotassi indotta da laminina in camera di Boyden su cellule DU145 e PC3 pre-trattate con Leuprolina e Cetrorelix. I risultati ottenuti hanno permesso di stabilire che il trattamento con gli analoghi del GnRH diminuisce, in modo significativo, l'attività migratoria delle cellule DU145 e PC3 rispetto ai controlli non trattati. Inoltre, grazie a studi di invasione è stato possibile verificare che le cellule DU145 e PC3 trattate con GnRH-A e con GnRH-ANT mostrano un'evidente e significativa diminuzione della capacità invasiva della matrice di MatrigelTM rispetto alle cellule di controllo non trattate.

L'attivazione del sistema attivatore del plasminogeno è nota promuovere diversi processi coinvolti nella migrazione cellulare *in vivo*, ed è un fattore fondamentale per i meccanismi che controllano invasione e capacità di formare metastasi delle cellule tumorali. L'osservazione che gli analoghi del GnRH riducono la loro capacità di invadere una matrice ricostituita di ECM e di migrare in risposta ad uno stimolo aptotattico fornisce un ulteriore supporto all'ipotesi che tali farmaci siano in grado di antagonizzare il comportamento metastatico delle cellule di CaP. Yates et al. (2005) hanno dimostrato che, nelle cellule DU145, il Cetrorelix aumenta l'espressione di molecole di adesione cellulare quali E-cadherin, α e β catenina e p120 attraverso una down-regolazione del sistema EGFR. Inoltre, è noto che il GnRH modula la capacità invasiva sia delle cellule trofoblastiche che delle cellule deciduali stromali umane attraverso il controllo dell'attività di uPA e PAI-1 (Chou et al., 2002 e 2003).

Sulla base di queste osservazioni, nel nostro laboratorio si è ulteriormente approfondito lo studio dell'interazione di GnRH-A e GnRH-ANT con il componente del complesso attivatore del plasminogeno responsabile dell'attivazione del sistema: il recettore per l'uPA (uPAR).

L'uPAR legandosi all'uPA è in grado di convertire il plasminogeno in plasmina responsabile di eventi degradativi della matrice extracellulare da parte della cellula tumorale. L'uPAR è una proteina ancorata alla membrana plasmatica grazie ad un legame glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI) ed oltre all'uPA è in grado di interagire con altre molecole fondamentali come vitronectina (VN) e integrine, condizionando in

maniera significativa le caratteristiche crescita, adesione ed invasività della cellula tumorale.

Attraverso tecniche di immunofluorescenza, abbiamo verificato la distribuzione dell'uPAR nelle cellule di CaP androgeno-indipendente DU145 e PC3, rilevando un'elevata espressione sia a livello della membrana che intracitoplasmatica del recettore che colocalizza con filamenti actinici a livello della membrana plasmatica.

Tenendo conto di queste osservazioni, abbiamo voluto studiare, tramite analisi Western Blotting, gli effetti di un trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT sull'espressione del recettore per l'uPA. I risultati ottenuti nei lisati cellulari di DU145 e PC3 mostrano che i livelli del recettore non sembrano essere modificati dal trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT. Al contrario, il trattamento sia con l'agonista che con l'antagonista del GnRH è in grado di aumentare l'espressione di uPAR solubile rilasciato nel mezzo di coltura di cellule di CaP umano androgeno-indipendente DU145 e PC3.

Il suPAR è generato dal taglio proteolitico dell'uPAR, catalizzato specificamente dalla fosfolipasi D (Wilhelm et al., 1994) a livello dell'ancora glicosil fosfatidil inositolica che lo lega alla membrana plasmatica delle cellule. Sia il recettore integro che la porzione solubile possono, poi, subire un altro evento proteolitico in corrispondenza della regione linker che unisce i domini D1 e D2, liberando in tal modo l'estremità D1 dal resto del recettore (Resnati et al., 1996; Beaufort et al., 2004).

In questi ultimi anni, sono stati pubblicati diversi lavori relativi allo studio della presenza del suPAR a livello del surnatante di vari tipi di tumore (all'ovaio: Riisbro et al., 2002; al polmone: Stephens et al., 1997; tumori del colon e del retto: Riisbro et al., 2002, Stephens et al., 1999, Fernebro et al., 2001), oltre alla sua rilevazione nel sangue di pazienti affetti da carcinoma prostatico (CaP) (Andreasen et al., 1997), ma ancora poco chiaro è il ruolo di questa molecola nella patologia prostatica.

Molti autori si sono soffermati sul valore prognostico del dosaggio plasmatico dei componenti del sistema attivatore del plasminogeno in molti tipi di tumore. Particolarmente evidente è risultata l'associazione tra gli alti livelli di espressione di uPA, uPAR e dell'inibitore principale del sistema, PAI-1, e lo sviluppo sfavorevole di tumori quali il cancro a mammella, ovaio, endometrio e tumori gastro-intestinali

(Duffy & Duggan, 2004). La up-regolazione dei componenti del sistema uPA che si manifesta in queste ed altre forme tumorali, sembra essere perciò responsabile del potenziamento degli effetti modulatori a livello di crescita, migrazione e adesione cellulare e, quindi, della ridotta aspettativa di vita di pazienti che presentano queste caratteristiche (Duffy & Duggan, 2004).

Un altro aspetto caratterizzante vari tipi di tumore è l'iperespressione di numerosi recettori per fattori di crescita, la cui attivazione ligando dipendente o indipendente è spesso responsabile della progressione della patologia tumorale. In particolare l'EGFR, appartenente alla famiglia di recettori i cui ligandi sono rappresentati dalla superfamiglia EGF (l'EGF, il TGF- β e l'HB-EGF), è molto spesso up-regolato in tumori come il carcinoma alla prostata (Mamoune et al., 2004).

L'associazione dei ligandi con il dominio extracellulare di EGFR attiva il recettore, che attraverso la fosforilazione di siti specifici nella porzione intracellulare attiva vie di traduzione che portano all'attivazione o modulazione dei processi cellulari come proliferazione, differenziazione, migrazione e sopravvivenza.

Il sistema EGF/EGFR è coinvolto nella progressione tumorale poiché è noto che mutazioni, iperespressione ed alterazioni nella via di segnale del recettore portano ad una trasformazione maligna (Grünwald & Manuel, 2003). L'attivazione del recettore per EGF è in grado di promuovere la progressione tumorale sia attraverso eventi epigenetici come la de-adesione e la riorganizzazione del citoscheletro, sia alterando il profilo trascrizionale delle cellule cancerogene (Mamoune et al., 2004).

Dai dati sopra esposti sembra evidente che l'iperespressione e la mancata regolazione dei sistemi EGFR ed uPAR porti alla promozione della progressione tumorale ed esistono dati che sembrano suggerire la colocalizzazione e l'interdipendenza dei due sistemi (Guerriero et al., 2004), anche se i meccanismi molecolari con cui essa si attua sono ancora da chiarire.

Sulla base di tutte queste osservazioni abbiamo voluto valutare l'espressione dei sistemi uPAR ed EGFR nelle cellule DU145. A tal fine, nella seguente trattazione sono riportati studi di immunofluorescenza doppia che dimostrano l'ampia colocalizzazione di uPAR con EGFR nelle cellule di CaP androgeno-indipendenti DU145.

Diversi dati sostengono che gli analoghi del GnRH sono in grado di bloccare la fosforilazione del recettore EGFR portando a down-regolazione della trasduzione dei segnali mitogeni e della proliferazione cellulare (Gründker et al., 2000).

In questa tesi è riportato l'effetto del trattamento cronico con GnRH-A e GnRH-ANT sull'espressione di P-EGFR/EGFR valutato attraverso analisi Western Blotting. I risultati ottenuti mostrano che sia l'agonista che l'antagonista GnRH sono in grado di inibire in modo significativo la fosforilazione del recettore per EGF.

Questi dati confermano quanto già riportato da altri laboratori secondo cui gli agonisti del GnRH interferiscono con gli stimoli proliferativi di fattori di crescita come EGF o IGF, antagonizzando quindi la proliferazione delle cellule tumorali (Emons et al., 1997; Moretti et al., 1996; Montagnani Marelli et al., 1999). Si ritiene che alcuni di questi meccanismi siano mediati dall'attivazione di una fosfatasi, responsabile della defosforilazione dei recettori per EGF, con conseguente soppressione dell'attivazione di proteine MAP chinasi e, quindi, della proliferazione cellulare (Emons et al., 1996).

Vari studi hanno dimostrato che le extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), membri della famiglia delle MAPK, giocano un importante ruolo nei segnali intracellulari mediati dall'attivazione dell'EGFR e l'inibizione dell'attività di ERK1/2 produce una significativa diminuzione sia della proliferazione che della migrazione cellulare (Mahabeleshwar et al., 2004). ERK1/2 gioca un ruolo importante anche nella regolazione di AP-1, poiché la sua attivazione porta all'induzione di c-fos che può associarsi con c-jun per formare un complesso eterodimerico AP-1. Quest'ultimo è noto controllare anche la regolazione del gene codificante l'uPA (Mahabeleshwar et al., 2004). Inoltre è noto che il recettore per l'uPA attraverso l'interazione con le integrine ed il recettore per l'EGF è in grado di controllare non solo l'adesione, ma anche il differenziamento e la migrazione cellulare. Tale interazione è mediata tramite l'attivazione di focal adhesion kinase (FAK), ERK e MAPK, e downregolazione di p38 MAPK (Liu et al., 2002). Questi effetti dipendono dall'interazione diretta di uPAR con le integrine, che in presenza di elevate concentrazioni di uPAR causa una costitutiva attivazione di ERK e del recettore per EGF (Aguirre-Ghiso et al., 2001).

E' pertanto plausibile che uPAR moduli la via di ERK nel controllo di migrazione e invasione cellulari. Tra le varie proteine responsabili della trasmissione

del segnale oltre alle integrine, al recettore per la lipoxina A₄, a caveolina ed alla glicoproteina 130, l'interazione con l'EGFR sembra essere un evento fondamentale per il controllo della migrazione cellulare (Aguirre-Ghiso et al., 1999; Yebra et al., 1996; Jo et al., 2003a; Mazzieri & Blasi, 2005).

Poiché l'attivazione di ERK sembra essere un nodo cruciale della regolazione dei due sistemi uPAR/EGFR abbiamo voluto valutare, l'effetto di un trattamento acuto con analoghi del GnRH sia sul recettore per EGF che sulla via di trasduzione del segnale delle MAPK osservando l'intermedio P-ERK-ERK1/2. A tale scopo le cellule sono state trattate a tempi diversi a con GnRH-A o GnRH-ANT ed al termine del trattamento sono state eseguite analisi Western Blotting. Dai risultati ottenuti appare evidente una riduzione della fosforilazione del recettore per EGF nelle cellule DU145 trattate rispetto a controlli non trattati; inoltre è possibile osservare come la fosforilazione di ERK, parzialmente indotta dopo 10 minuti, venga ridotta in maniera significativa 40 minuti dopo il trattamento con l'analogo agonista del GnRH. Lo stesso tipo di andamento è stato evidenziato quando le cellule DU145 sono state trattate con l'analogo antagonista del GnRH.

Dai risultati ottenuti appare chiaro che, nelle cellule DU145, sia l'agonista che l'antagonista GnRH sono in grado di inibire, dopo una parziale induzione, la fosforilazione di ERK, un elemento comune nella trasduzione dei segnali uPAR/EGFR dipendente.

Per chiarire ulteriormente l'effetto sulla fosforilazione di ERK1/2 da parte degli analoghi del GnRH le cellule di CaP umano androgeno-indipendente DU145 sono state pretrattate per 1 ora con un inibitore specifico di MEK-1, il PD98059 (10^{-5} M), e quindi successivamente trattate per 10 minuti con GnRH-A (10^{-6} M) e GnRH-ANT (10^{-6} M). I livelli di P-ERK1/2 e ERK1/2 sono stati analizzati tramite Western Blotting. Dai risultati ottenuti è possibile osservare che il pretrattamento con l'inibitore PD98059 attenua completamente la fosforilazione di ERK1/2 indotta dagli analoghi del GnRH nelle cellule di CaP androgeno-indipendenti DU145, mentre non si osservano differenze significative nelle cellule trattate con il DMSO né nelle cellule trattate con il solo PD98059. Questi risultati, ottenuti sulle cellule di CaP umano androgeno-indipendenti DU145, sono in accordo con studi condotti su cellule di carcinoma ovarico umano CaOV-3 nei quali Kim et al. (2005) hanno dimostrato che il

GnRH II è in grado di indurre un effetto antiproliferativo attraverso l'attivazione sia di ERK1/2 che di p38 MAPK responsabili a loro volta dell'attivazione di fattori di traduzione Elk-1 ed AP-1. Dai dati qui presentati sembra di poter avanzare l'ipotesi che gli analoghi del GnRH siano in grado di antagonizzare la proliferazione delle cellule di CaP androgeno-indipendenti inibendo la fosforilazione di recettori per fattori di crescita, come il recettore per l'EGF. Risulta inoltre importante sottolineare che sia il sistema ERK1/2 che la p38 MAPK giocherebbero un ruolo fondamentale nell'inibizione della crescita di cellule di CaP DU145. Va inoltre puntualizzato il consistente effetto che gli analoghi del GnRH esercitano sul sistema attivatore del plasminogeno nelle cellule di CaP androgeno-indipendenti. A tale proposito, risulta interessante il fatto che gli analoghi del GnRH, oltre ad inibire la liberazione di uPA e contemporaneamente ad aumentare i livelli di PAI-1 da parte delle cellule DU145, inducono anche un aumento della porzione solubile del recettore per l'uPA.

Da studi riportati in letteratura, è noto che in pazienti affetti da CaP sono stati rilevati elevati livelli circolanti di uPAR solubile; questi sembrano derivare dalle cellule tumorali oppure dalle vicine cellule stromali (Miyake et al., 1999; McCabe et al., 2000). Negli stessi pazienti, si è ritrovato a livello urinario sia il suPAR che i suoi prodotti di taglio proteolitico, i frammenti D1 e D2-D3 (Sidenius et al., 2000), ad alta concentrazione. Questi frammenti derivano dal taglio di uPAR catalizzato da diverse proteasi in aree distanti dell'organismo, in particolare in tessuti tumorali (Sidenius & Blasi, 2003). Tuttavia, secondo Piironen et al. (2006) le varie forme solubili di uPAR potrebbero rivestire importanza differente come marker di valore prognostico in pazienti affetti da CaP. Sembra infatti che le forme più avanzate di CaP esprimano maggiormente le forme D1 e D2-D3 dell'uPAR rispetto alla forma intatta del recettore con i tre domini D1-D2-D3. Per questo motivo sembra essere molto più importante ai fini diagnostici il dosaggio delle varie porzioni rispetto alla forma completa del recettore per l'uPA in rapporto con l'espressione del PSA nel sangue di pazienti affetti da patologia tumorale (McCabe et al., 2000).

Nonostante il ruolo della porzione solubile dell'uPAR nella progressione del CaP sia ancor oggi poco chiaro, recentemente sono comparsi lavori secondo i quali in modelli animali xenotrapiantati di cellule tumorali ovariche ed di mammella iperesprimenti la porzione solubile del recettore per l'uPA, si è osservata la riduzione

della crescita e dell'invasività tumorali (Krüger et al., 2000; Lutz et al., 2001). Pertanto, in una nuova serie di esperimenti abbiamo voluto indagare l'effetto del trattamento con suPAR ricombinante umano sulla proliferazione di cellule di CaP.

Per questo motivo, attraverso un saggio di incorporazione di timidina marcata con trizio, un test di conta cellulare ed un'analisi FACScan si è potuto analizzare l'effetto dell'uPAR solubile sulla proliferazione delle cellule DU145. Il trattamento con suPAR induce sia una riduzione dell'incorporazione di timidina che un'inibizione significativa della crescita delle cellule DU145. La percentuale di inibizione rispetto ai controlli non trattati si aggira nell'ordine del 20% sempre per la dose di suPAR 10^{-8} M. Questi risultati confermano quanto altri autori hanno verificato in altri tipi di tumore come il cancro ovarico e mammario (Krüger et al., 2000; Lutz et al., 2001).

In seguito all'osservazione che il trattamento con il suPAR induce nelle cellule di CaP androgeno-indipendente DU145 un'inibizione della proliferazione, abbiamo voluto indagare se tale inibizione fosse associata ad alterazioni del ciclo cellulare. Dai risultati ottenuti è possibile evidenziare come l'effetto del trattamento di 24 ore con suPAR induca un aumento dell'apoptosi dal 2% delle cellule controllo, al 18% delle cellule DU145 trattate. Inoltre, a seguito del trattamento con suPAR, si osserva una riduzione della popolazione di cellule in fase G_0/G_1 , accompagnata da un aumento delle cellule in fase G_2/M , mentre la popolazione di cellule in fase S risulta essenzialmente invariata. Questi risultati sembrano evidenziare come l'effetto del trattamento con il suPAR sia in grado di indurre l'inibizione della capacità proliferativa delle cellule DU145; tale inibizione probabilmente avviene attraverso un meccanismo che coinvolge la modulazione dei segnali mitogenici che controllano la regolazione del ciclo cellulare.

I risultati dei nostri esperimenti circa l'effetto del trattamento con suPAR sulla proliferazione delle cellule DU145 sembrano essere in linea con la letteratura (Magdolen et al., 2003; Lutz et al., 2001; Jo et al., 2003a,b).

Lutz et al. (2001) e Magdolen et al. (2003) hanno riportato gli effetti che la transfezione del plasmide esprimente la forma solubile dell'uPAR (suPAR) in cellule di carcinoma ovarico e mammario produce sulla proliferazione. Gli elevati livelli di sintesi del suPAR ricombinante inibiscono la proliferazione cellulare e riducono la capacità di degradare la ECM delle cellule OV-MZ-6#8 e delle cellule di carcinoma

mammario MDA-MB-231. Le cellule transfettate con il plasmide esprimente suPAR sono state poi impiantate in topi nudi ed è stato verificato che la sintesi di elevati livelli di suPAR provoca una significativa riduzione della crescita tumorale nel modello di topo xenotrapiantato. Pertanto sia Magdolen et al. (2003) che Lutz et al. (2001) concludono che elevati livelli di suPAR in cellule tumorali ovariche e di mammella, potrebbero agire da molecole “scavenger” per l'uPA prodotto dalle cellule di CaP interferendo quindi con tutte le attività in cui la serino proteasi uPA è impiegata, dal controllo della proliferazione alla capacità migratoria ed invasiva.

Questa ipotesi è supportata anche da altri autori secondo cui il suPAR è in grado di legare specificamente la serino proteasi uPA come un anticorpo ad alta affinità e rendendo, in tal modo, meno disponibile l'uPA per il legame al recettore uPAR (Resnati et al., 1996 e 2002; Krüger et al., 2000; Wilhelm et al., 1994). Inoltre, il recettore uPAR in forma solubile sarebbe in grado di competere con lo stesso complesso uPA/uPAR prodotto dalle cellule tumorali nell'interazione con integrine e vitronectina, riducendo la capacità metastatica delle cellule tumorali (Resnati et al., 1996 e 2002).

Il ruolo della porzione solubile del recettore per l'uPA sull'attivazione della MAPK ERK1/2 è stato riportato da Jo et al. (2003a,b). Secondo questo autore il trattamento con suPAR induce un effetto inibitorio sulla proliferazione, sull'attivazione di ERK1/2 e sulla capacità migratoria di cellule di carcinoma mammario MDA-MB-231 iperesprimenti il sistema uPA/uPAR. L'effetto della porzione solubile dell'uPAR sarebbe invece di tipo stimolatorio sulla fosforilazione di ERK1/2, agendo come parziale agonista, in cellule deprivate del recettore endogeno dell'uPA, come evidenziato in cellule di fibroblasti embrionali murine silenziate geneticamente per l'uPAR.

Come già detto in precedenza, la crescita cellulare è stimolata dall'attivazione della via di segnale intracellulare indotta dal legame dell'uPA al suo recettore. Il recettore per l'uPA, attraverso l'attivazione di ERK, FAK e MAPK, modula non solo la proliferazione e l'adesione, ma anche il differenziamento e la migrazione cellulare (Liu et al., 2002). Questi ultimi effetti, come già discusso, dipendono dall'interazione diretta di uPAR con le integrine; in presenza di elevate concentrazioni del recettore,

come accade in molti tipi di tumori, questa interazione causa una costitutiva attivazione di ERK e del recettore a monte, EGFR (Aguirre-Ghiso et al., 2001).

La fosforilazione di ERK sembra essere, quindi, un nodo cruciale nei meccanismi di progressione tumorale. Per questo motivo, si è pensato di valutare, mediante l'analisi Western Blotting, l'eventuale modulazione dell'espressione della forma attiva fosforilata di queste chinasi in seguito al trattamento delle cellule DU145 con suPAR. Negli studi effettuati in seguito al trattamento delle cellule DU145 con suPAR si è verificato che il suPAR è in grado di diminuire, in maniera dose-dipendente, i livelli di ERK fosforilato nelle cellule di CaP androgeno-indipendente DU145.

L'effetto del suPAR sull'inibizione della fosforilazione di ERK sembra essere specifica in quanto tagliando la molecola dell'uPAR solubile con proteasi aspecifiche, come la chimotripsina, il frammento ottenuto, aggiunto alle cellule DU145, non è più in grado di inibire l'attivazione di ERK.

Da ultimo, la nostra attenzione si è spostata sulla modulazione della capacità invasiva e migratoria, quindi metastatica, esercitata dal suPAR in cellule di CaP androgeno-indipendente DU145.

Questi meccanismi dipendono dalla capacità di uPAR di associarsi lateralmente con le integrine, presenti sulla stessa membrana plasmatica delle cellule tumorali, da un lato (Woodhouse et al., 1997), e con componenti fondamentali della ECM, come la vitronectina, dall'altro (Wei et al., 1994). In più, è essenziale l'attività proteolitica esercitata dal sistema attivatore del plasminogeno sulla struttura proteica della stessa ECM (Andreasen et al., 1997).

I risultati riportati in questa tesi relativi alla capacità del suPAR di inibire migrazione ed invasività delle cellule di CaP concordano con quanto diversi autori hanno già osservato in altri modelli tumorali come il cancro ovarico ed alla mammella (Magdolen et al., 2003; Jo et al., 2003a,b).

In conclusione, i dati riportati in questa tesi suggeriscono l'ipotesi che sia gli agonisti che gli antagonisti del GnRH sono in grado di inibire la capacità proliferativa e di progressione metastatica delle cellule di CaP androgeno-indipendenti DU145 e PC3. Tale effetto è, secondo i dati qui riportati, attribuibile all'azione che gli analoghi del GnRH producono anche sull'attività del sistema attivatore del plasminogeno,

agendo sia sull'espressione e sull'attività dell'uPA che a livello del recettore per l'uPA. In aggiunta, gli studi effettuati nel nostro laboratorio hanno evidenziato che anche il trattamento con la porzione solubile del recettore per l'uPA produce un effetto antiproliferativo sulla crescita delle cellule di CaP androgeno-indipendente DU145. Inoltre, la porzione solubile del recettore per l'uPA, aggiunto in coltura delle cellule di CaP, è in grado di antagonizzare la progressione metastatica del cancro prostatico umano attraverso un'inibizione della migrazione e dell'invasività delle stesse cellule. I complessi meccanismi molecolari attraverso i quali questa molecola agisce risultano ancora non perfettamente chiariti, anche in considerazione del significato discordante che diversi autori associano agli aumentati livelli del suPAR e dei suoi metaboliti in molti tipi di tumore e del significato prognostico che il suPAR riveste. Nonostante i dati riportati in questa tesi forniscano la base per poter avanzare ipotesi concrete sul ruolo svolto dal suPAR nei processi proliferativi, migratori ed invasivi del CaP, saranno, pertanto, necessari ulteriori studi per poter meglio delineare il significato della porzione solubile del recettore per l'uPA nel controllo dei meccanismi molecolari che portano alla progressione tumorale.

FIGURE

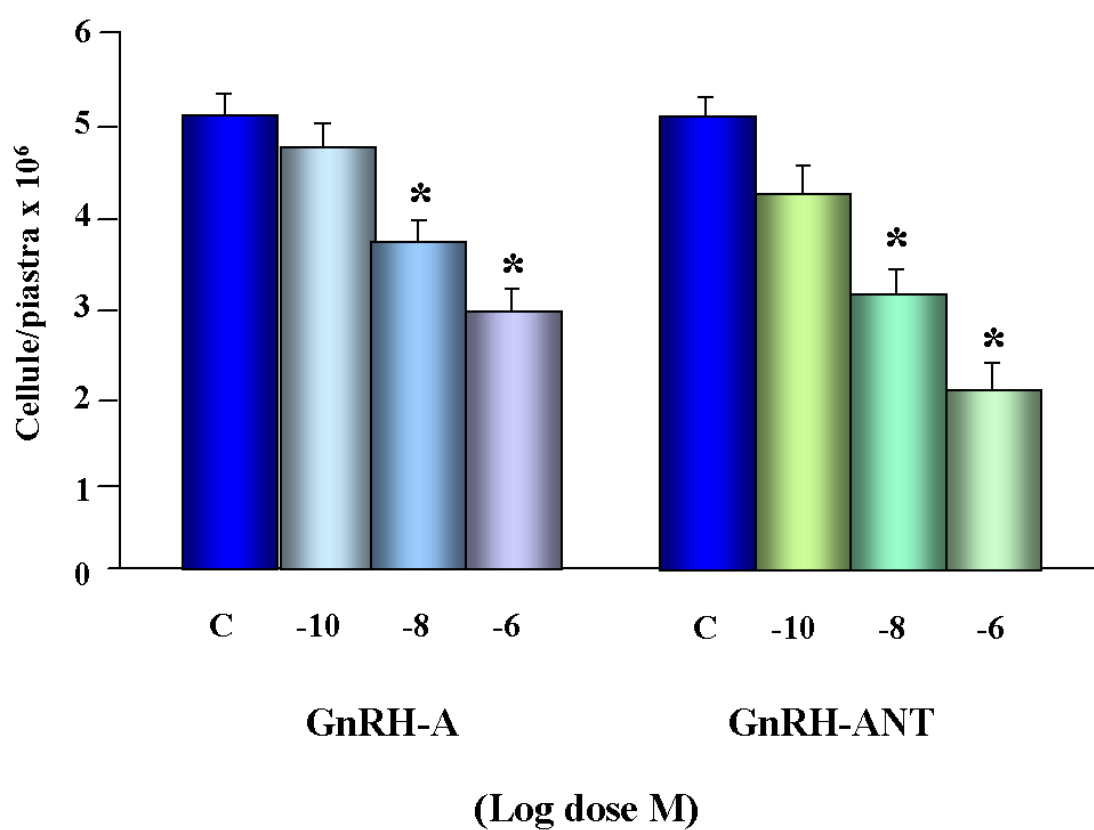


Figura 5: Effetto del trattamento di 6 giorni con diverse concentrazioni di GnRH-A e GnRH-ANT sulla proliferazione della linea cellulare di carcinoma prostatico androgeno-indipendente DU145. *p < 0.05 vs C, controlli.

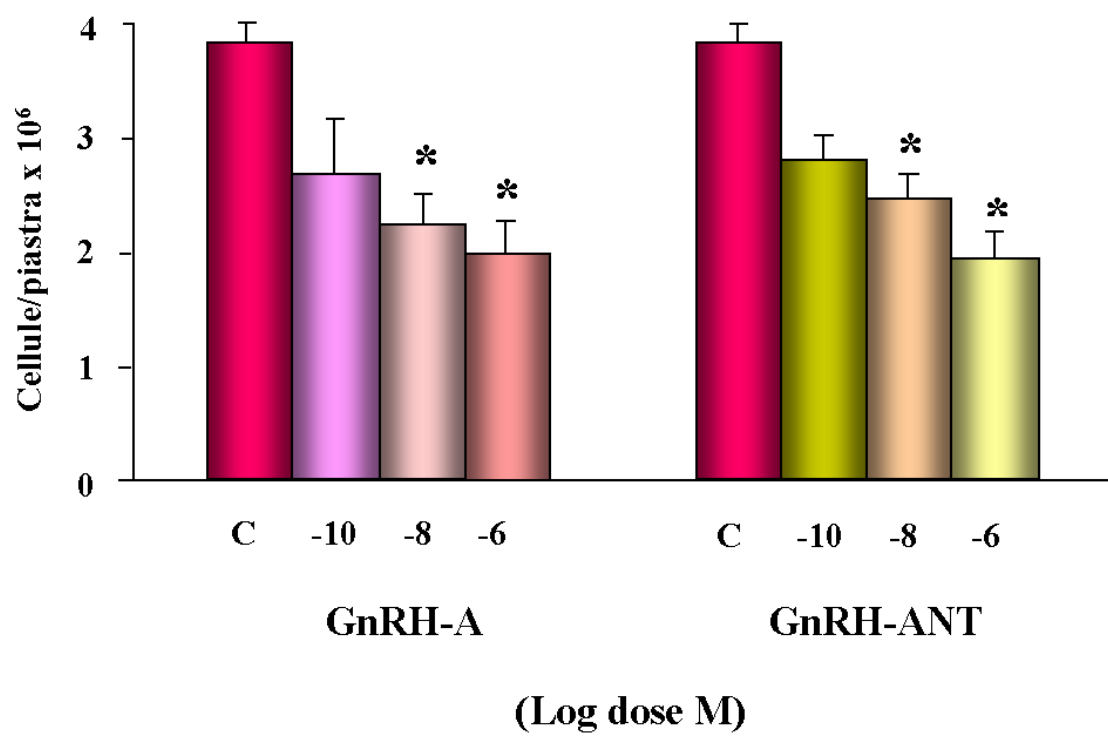


Figura 6: Effetto del trattamento di 6 giorni con diverse concentrazioni di GnRH-A e GnRH-ANT sulla proliferazione della linea cellulare di carcinoma prostatico androgeno-indipendente PC3. *p < 0.05 vs C, controlli

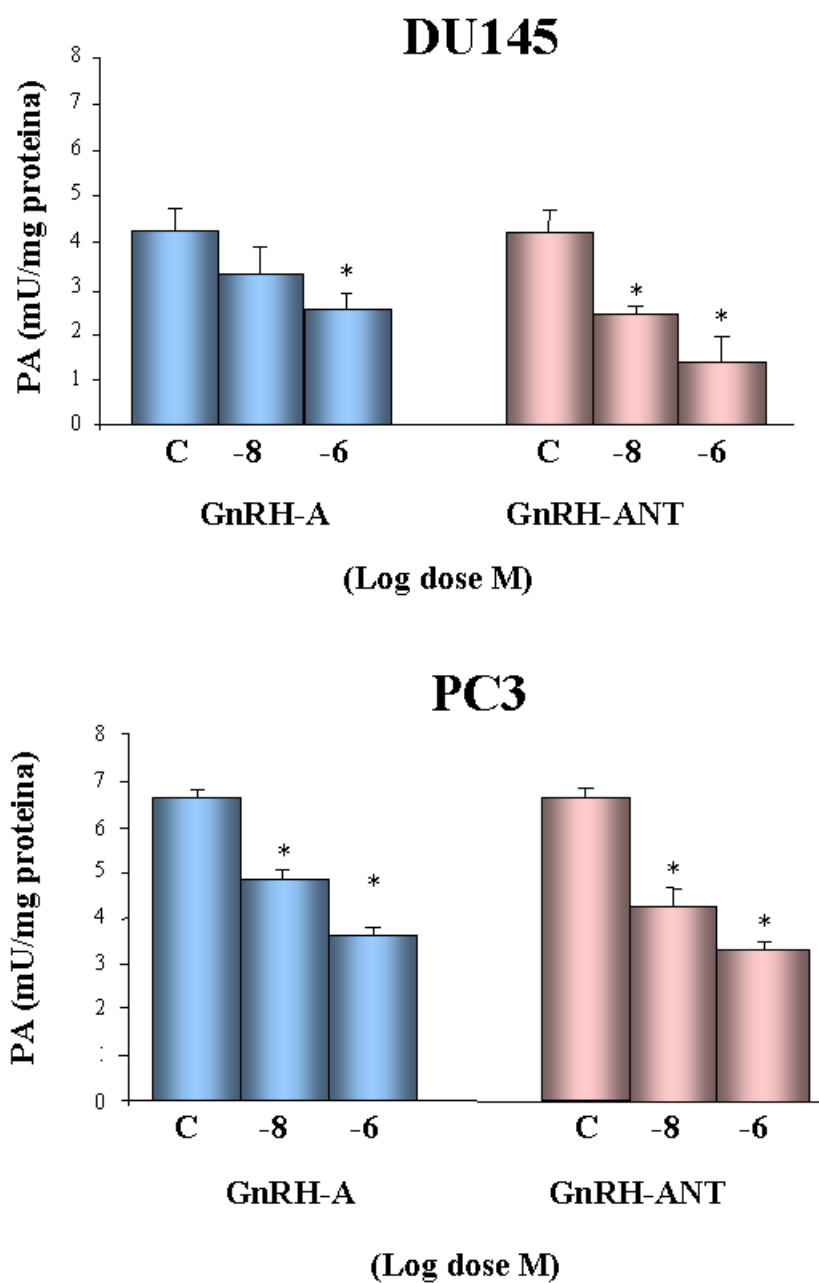


Figura 7: Effetto del trattamento di 24 ore con diverse concentrazioni di GnRH-A e GnRH-ANT sui livelli di PA secreto nel mezzo condizionato delle linee cellulari di carcinoma prostatico androgeno-indipendente DU145 e PC3.
 *p < 0.05 vs C, controlli

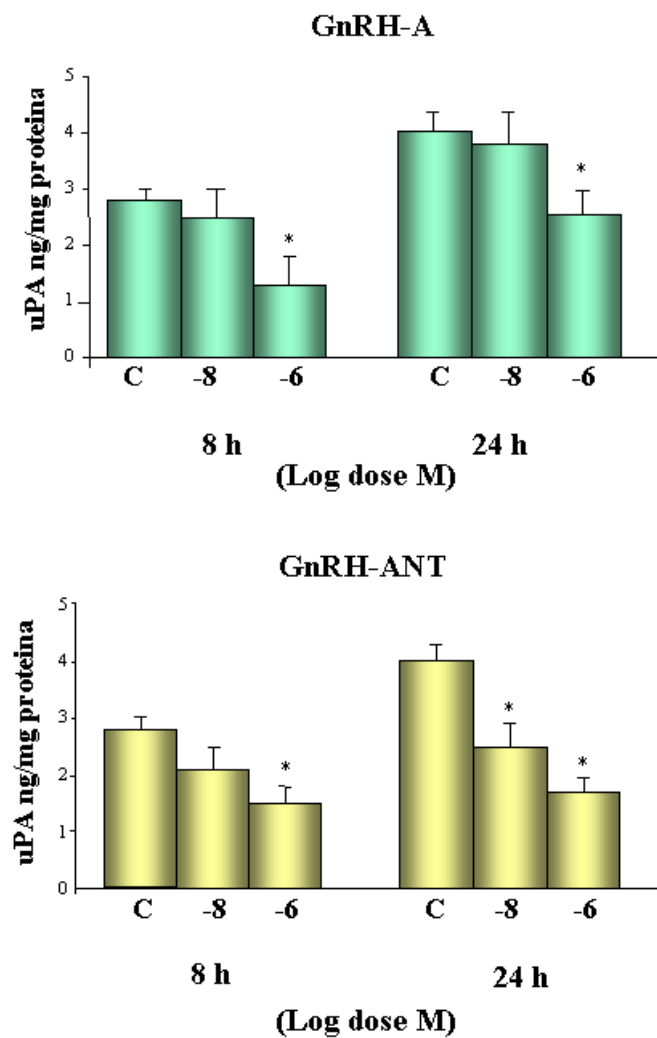


Figura 8: Effetto del trattamento di 8 e 24 ore con diverse concentrazioni di GnRH-A e GnRH-ANT sui livelli di uPA secreto nel mezzo condizionato di cellule di carcinoma prostatico androgeno-indipendente DU145. * $p < 0.05$ vs C, controlli

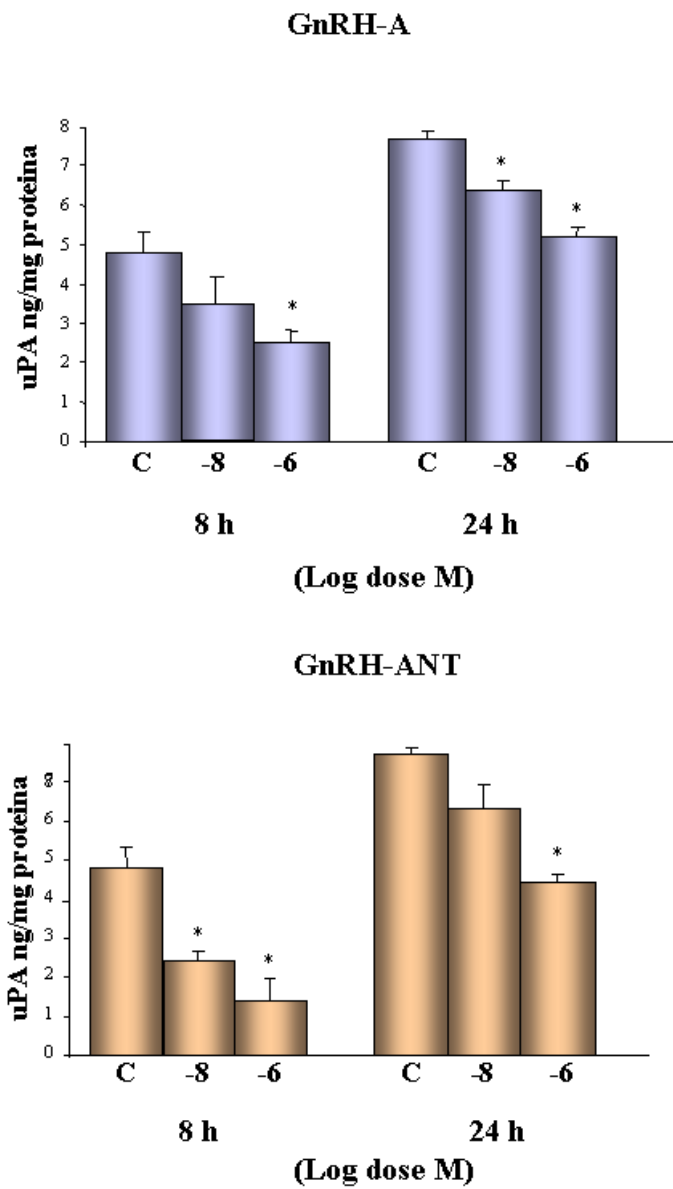


Figura 9: Effetto del trattamento di 8 e 24 ore con diverse concentrazioni di GnRH-A e GnRH-ANT sui livelli di uPA secreto nel mezzo condizionato di cellule di carcinoma prostatico androgeno-indipendente PC3. * $p < 0.05$ vs C, controlli.

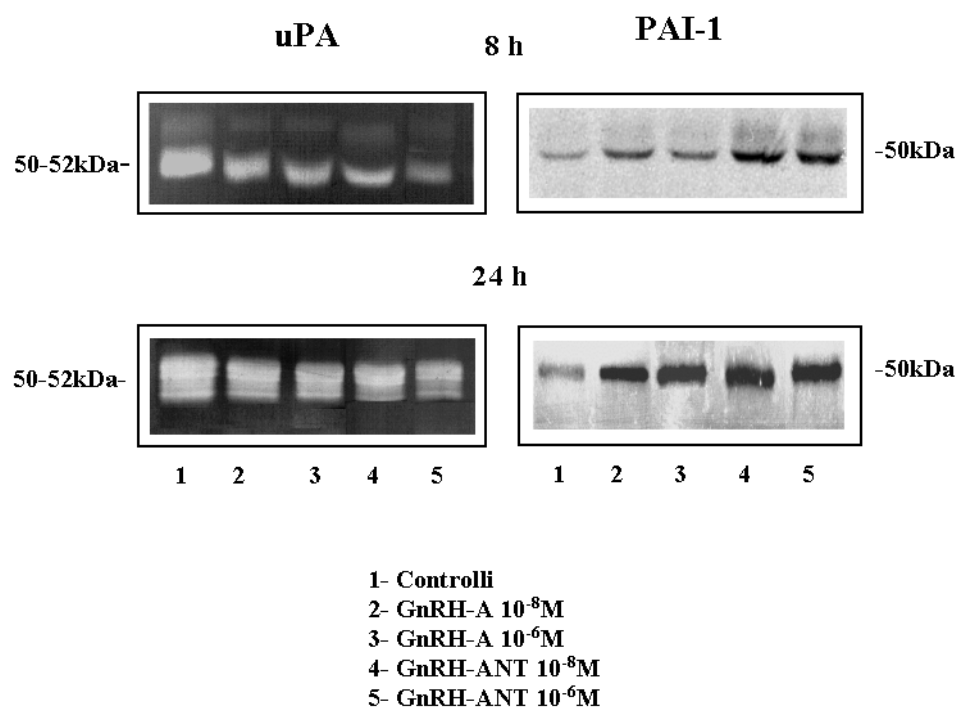


Figura 10: Analisi zimografica di uPA e Western Blotting di PAI-1 secreti nel mezzo condizionato delle cellule di carcinoma prostatico androgeno-indipendente DU145 trattate con diverse concentrazioni di GnRH-A e GnRH-ANT per 8 e 24 ore.

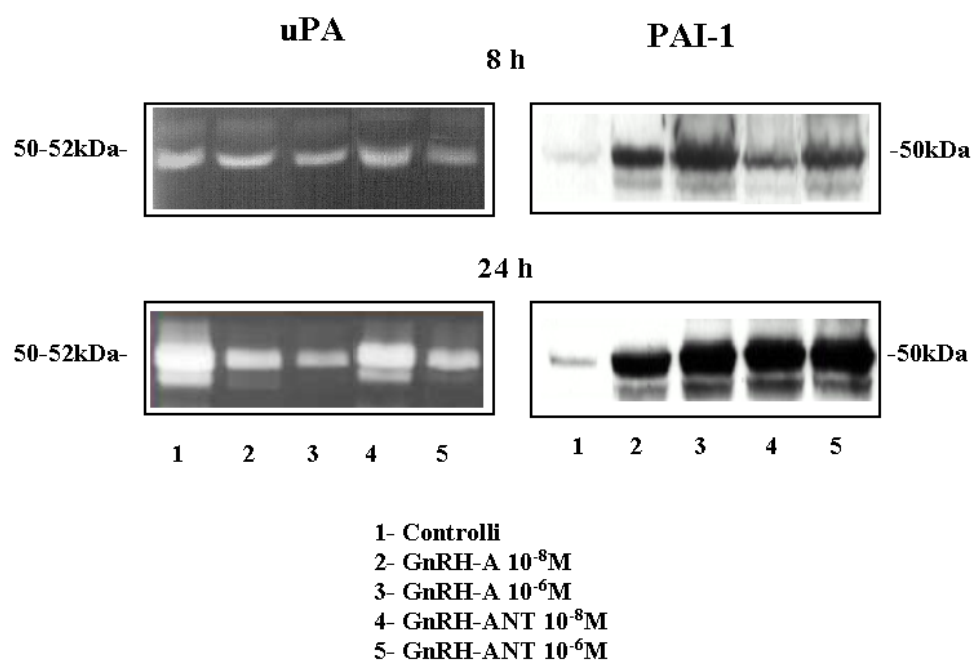


Figura 11: Analisi zimografica di uPA e Western Blotting di PAI-1 secreti nel mezzo condizionato delle cellule di carcinoma prostatico androgeno-indipendente PC3 trattata con GnRH-A e GnRH-ANT per 8 e 24 ore.

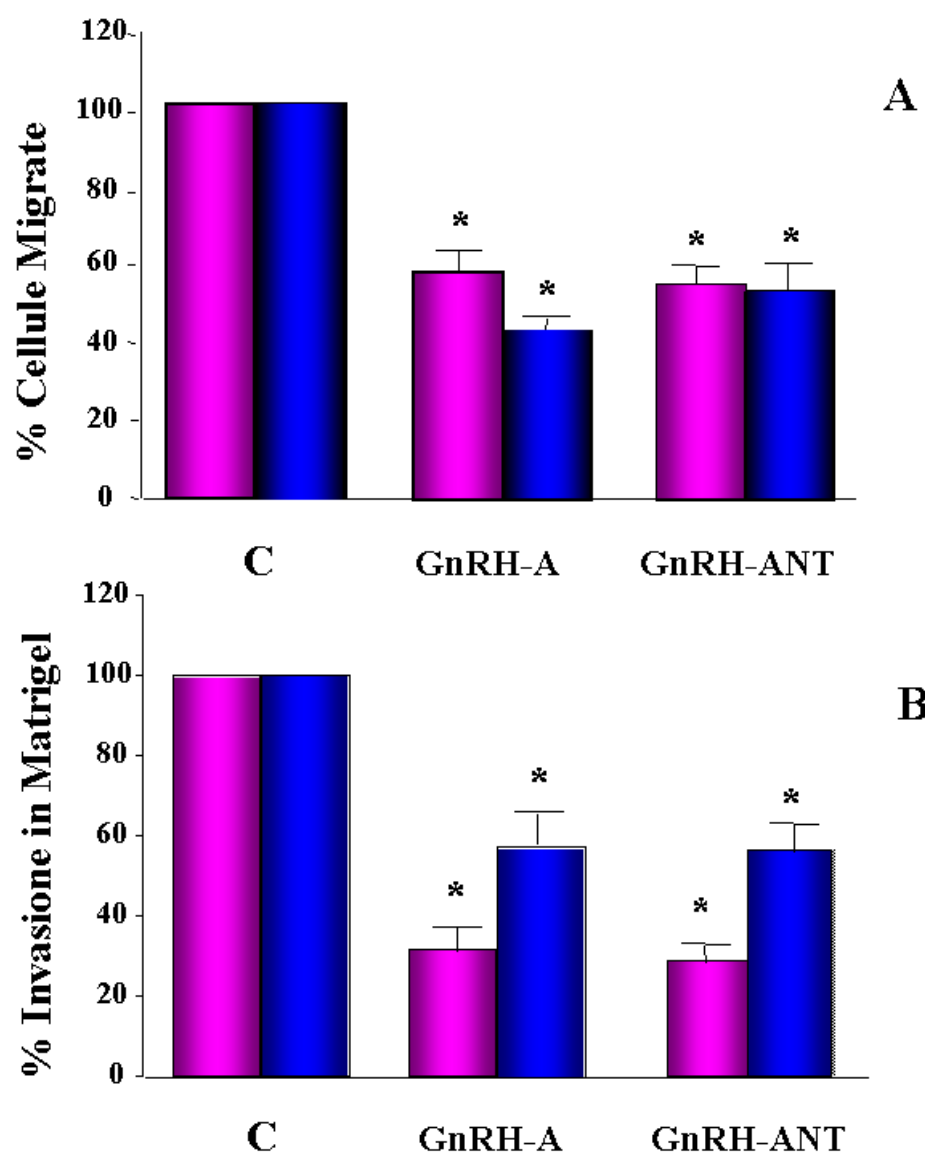


Figura 12: Effetto del pre-trattamento di 6 giorni con GnRH-A (10^{-6} M) e GnRH-ANT (10^{-6} M) sulla capacità migratoria (pannello A) ed invasiva (pannello B) delle cellule DU145 (■) e PC3 (■).

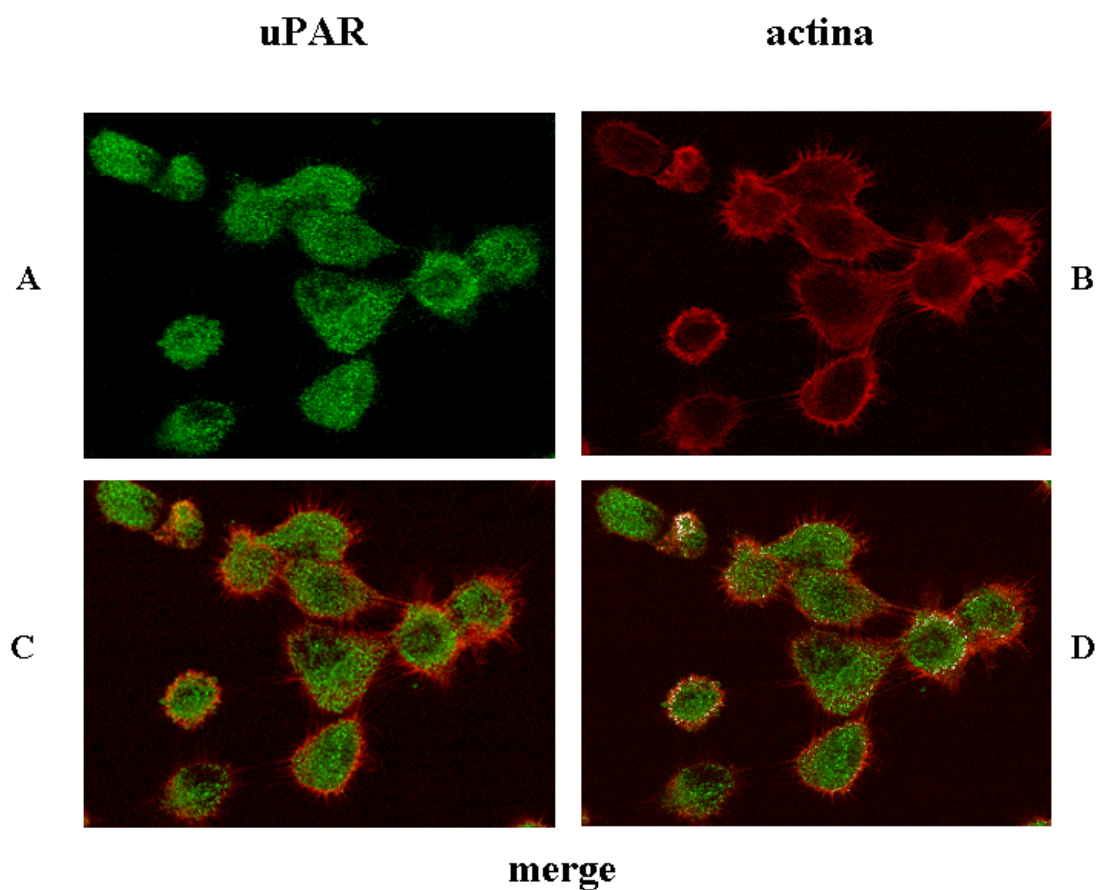


Figura 13: Distribuzione di uPAR (verde, pannello A) e di actina (rosso, pannello B) in cellule di CaP androgenico indipendente DU145. Le immagini sono state ottenute mediante tecniche di immunofluorescenza doppia. Nel pannello C è visibile la localizzazione di uPAR rispetto ai filamenti actinici. Mentre nel pannello D la maschera di colocalizzazione di uPAR-actina è evidenziata in bianco.

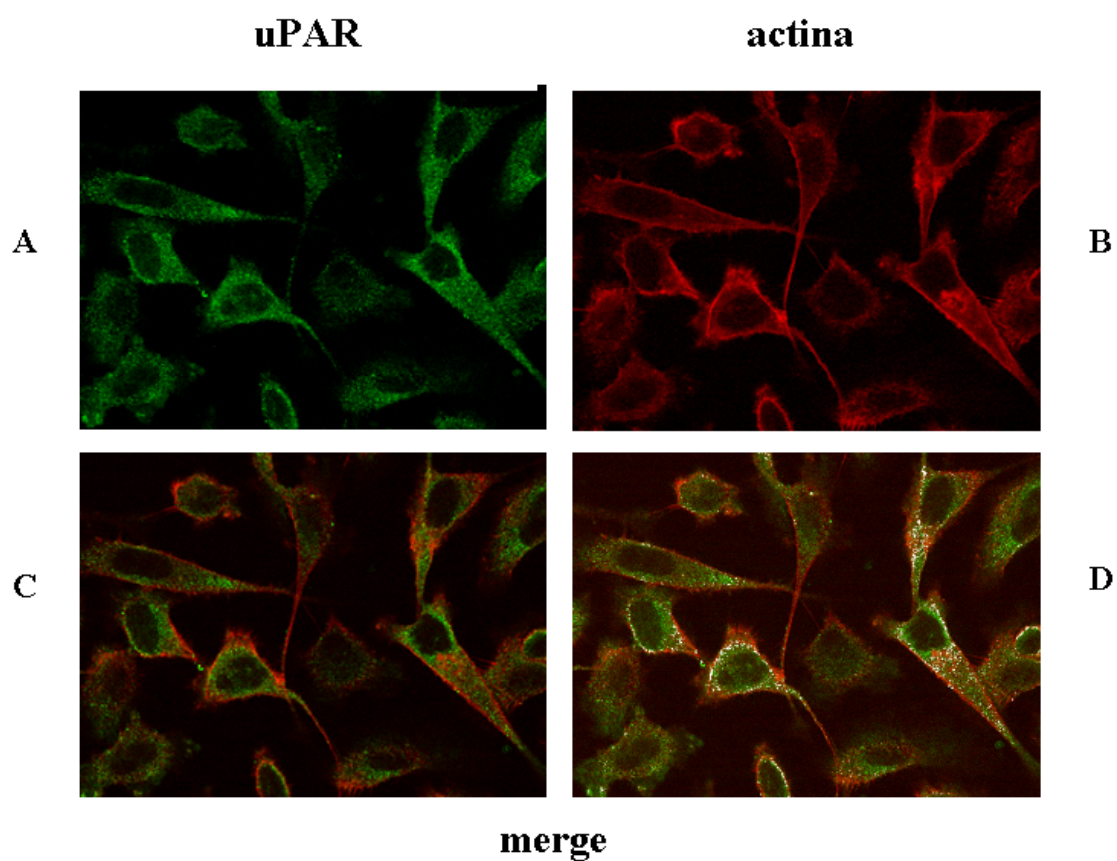


Figura 14: Distribuzione di uPAR (verde, pannello A) e di actina (rosso, pannello B) in cellule di CaP androgenico indipendente PC3. Le immagini sono state ottenute mediante tecniche di immunofluorescenza doppia. Nel pannello C è visibile la localizzazione di uPAR rispetto ai filamenti actinici. Mentre nel pannello D la maschera di colocalizzazione di uPAR-actina è evidenziata in bianco.

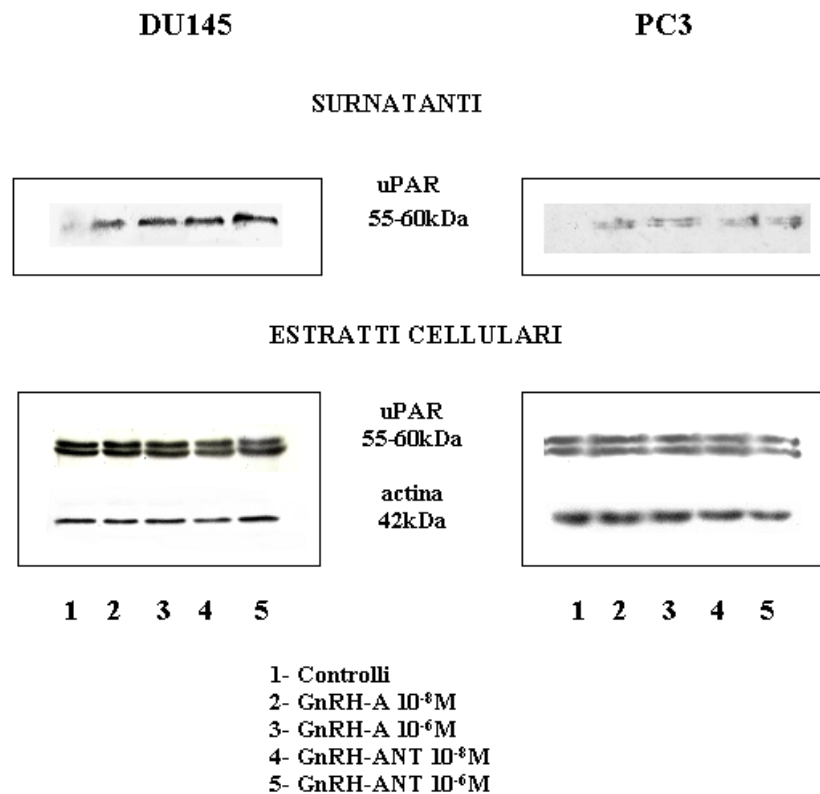


Figura 15: Analisi Western Blotting di uPAR nel surnatante e negli estratti cellulari delle cellule di CaP DU145 e PC3 trattate e non per 6 giorni con dosi diverse (10^{-8} - 10^{-6} M) di GnRH-A e GnRH-ANT.

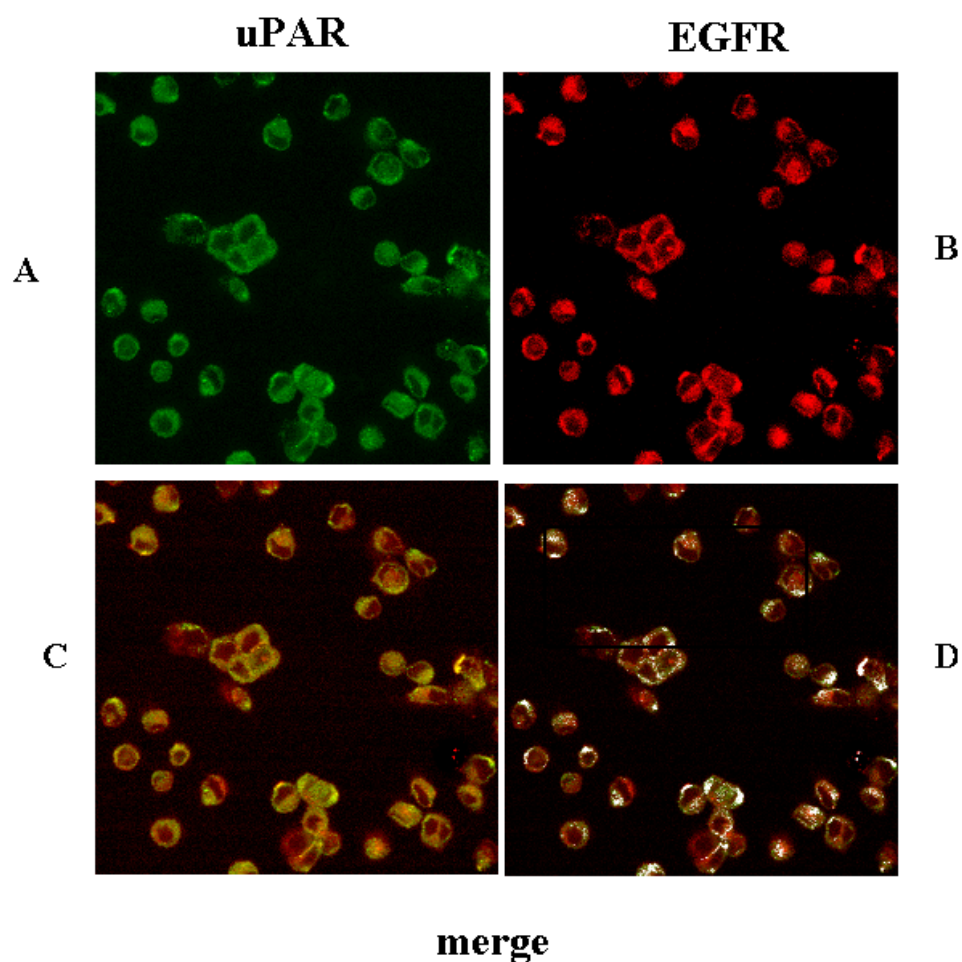
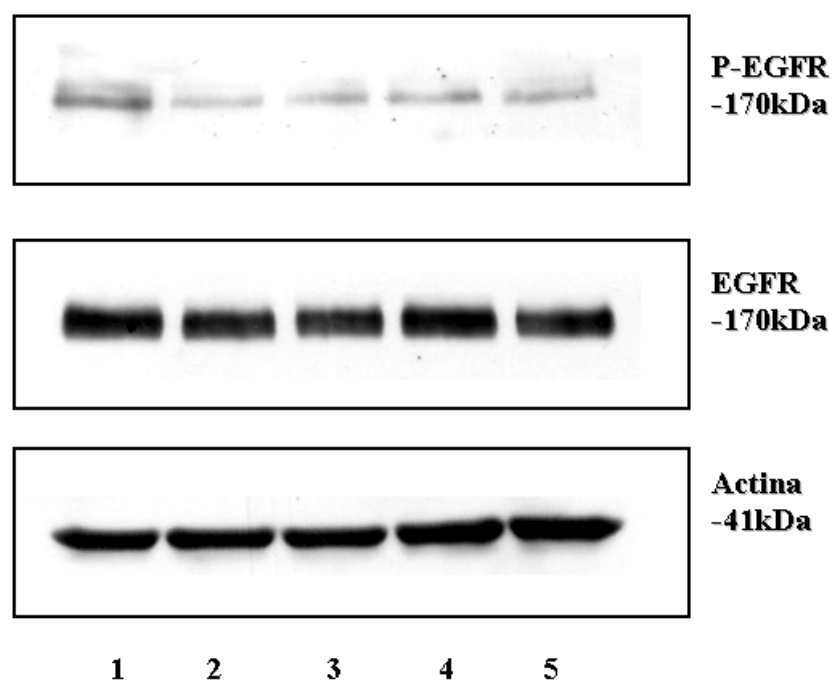


Figura 16: Distribuzione di uPAR (verde, pannello A) e di EGFR (rossa, pannello B) in cellule di CaP androgeno-indipendenti DU145. Le immagini sono state ottenute mediante tecniche di immunofluorescenza doppia. Nel pannello C è visibile la colocalizzazione di uPAR ed EGFR evidenziata dalla sovrapposizione dell'immunofluorescenza verde (uPAR) con quella rossa (EGFR). Nel pannello D la maschera di colocalizzazione di uPAR-EGFR è evidenziata in bianco.



- 1 - Controlli
- 2 - GnRH-A 10⁻⁸M
- 3 - GnRH-A 10⁻⁶M
- 4 - GnRH-ANT 10⁻⁸M
- 5 - GnRH-ANT 10⁻⁶M

Figura 17: Analisi Western Blotting di P-EGFR/EGFR negli estratti cellulari di cellule di CaP DU145 trattate e non per 6 giorni con GnRH-A (10⁻⁸-10⁻⁶M) e GnRH-ANT (10⁻⁸-10⁻⁶M).

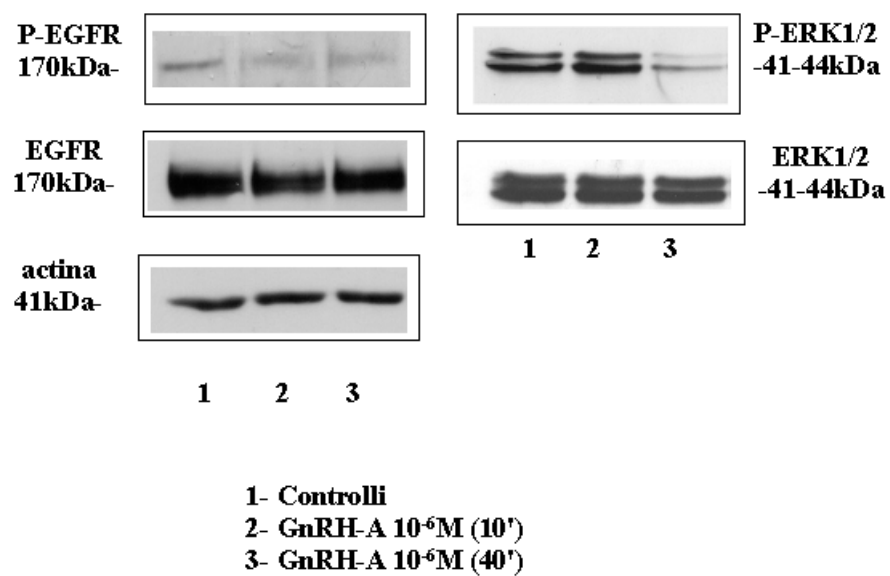


Figura 18: Analisi Western Blotting di P-EGFR, EGFR, P-ERK1/2 ed ERK1/2 negli estratti cellulari di DU145 trattate per 10 e 40 minuti con GnRH-A 10⁻⁶M.

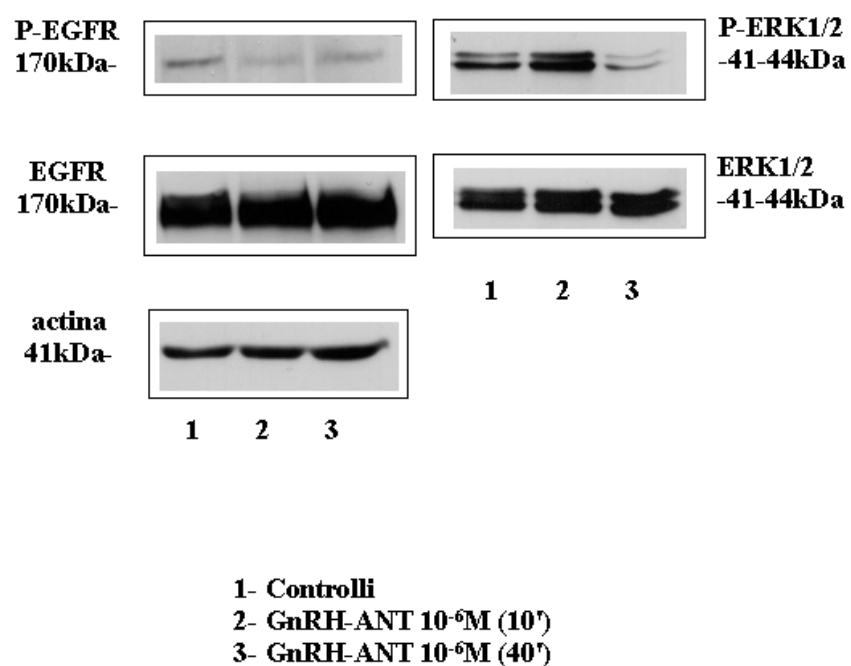


Figura 19: Analisi Western Blotting di P-EGFR, EGFR, P-ERK1/2 ed ERK1/2 negli estratti cellulari di DU145 trattate per 10 e 40 minuti con GnRH-ANT (10^{-6} M).

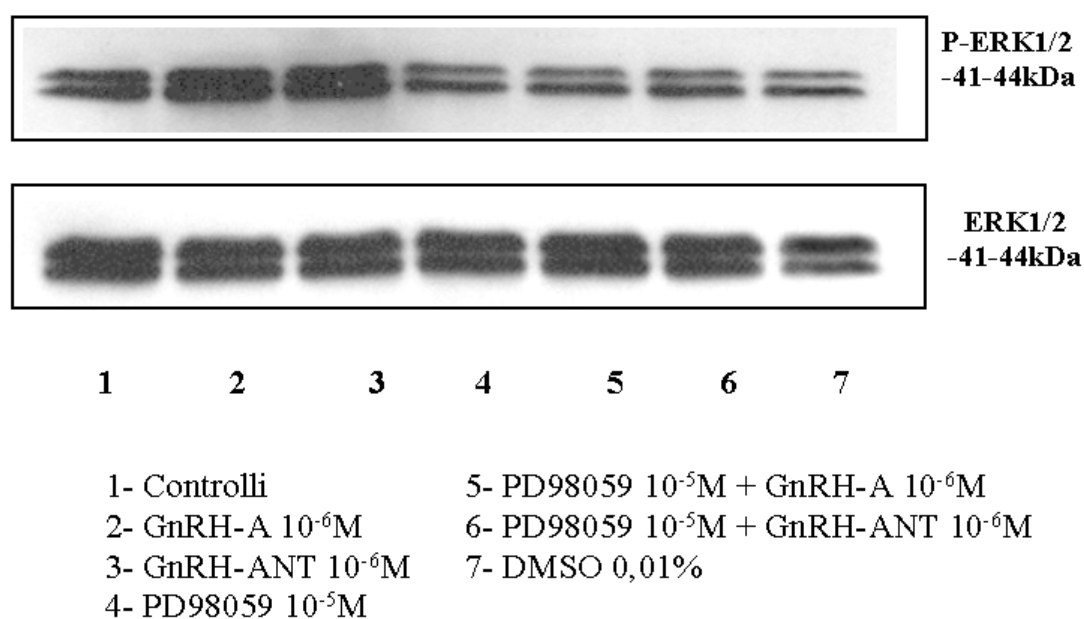


Figura 20: Effetto del trattamento con GnRH-A e GnRH-ANT sulla fosforilazione di ERK1/2 in presenza e assenza dell'inibitore PD98059. Le cellule DU145 sono state pretrattate per 1 ora con PD98059 (10^{-5} M) seguito da un trattamento di 10 minuti con GnRH-A (10^{-6} M) e GnRH-ANT (10^{-6} M). Un controllo è stato trattato con il solo veicolo. I livelli di P-ERK1/2 e ERK1/2 sono stati analizzati tramite Western Blotting.

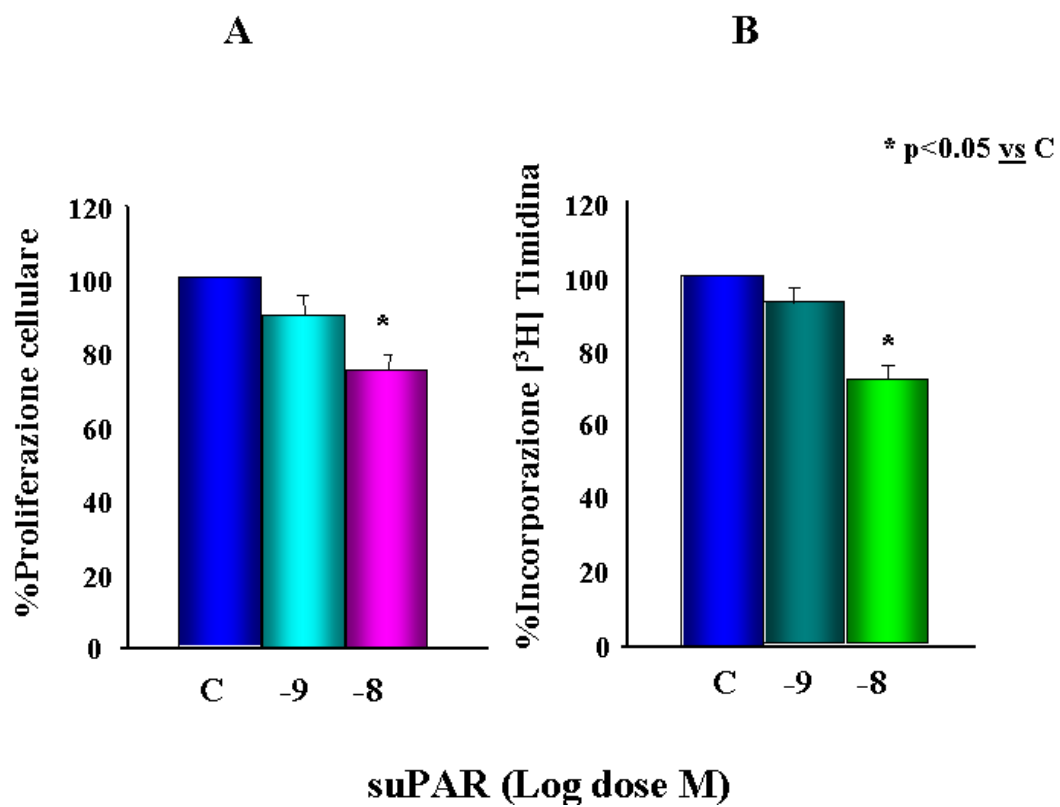


Figura 21: Effetto del trattamento di 48 ore con suPAR (10^{-9} - 10^{-8} M) sulla proliferazione cellulare (pannello A) e sull'incorporazione di timidina radiomarcata con trizio (pannello B) in cellule di CaP androgeno-indipendente DU145.

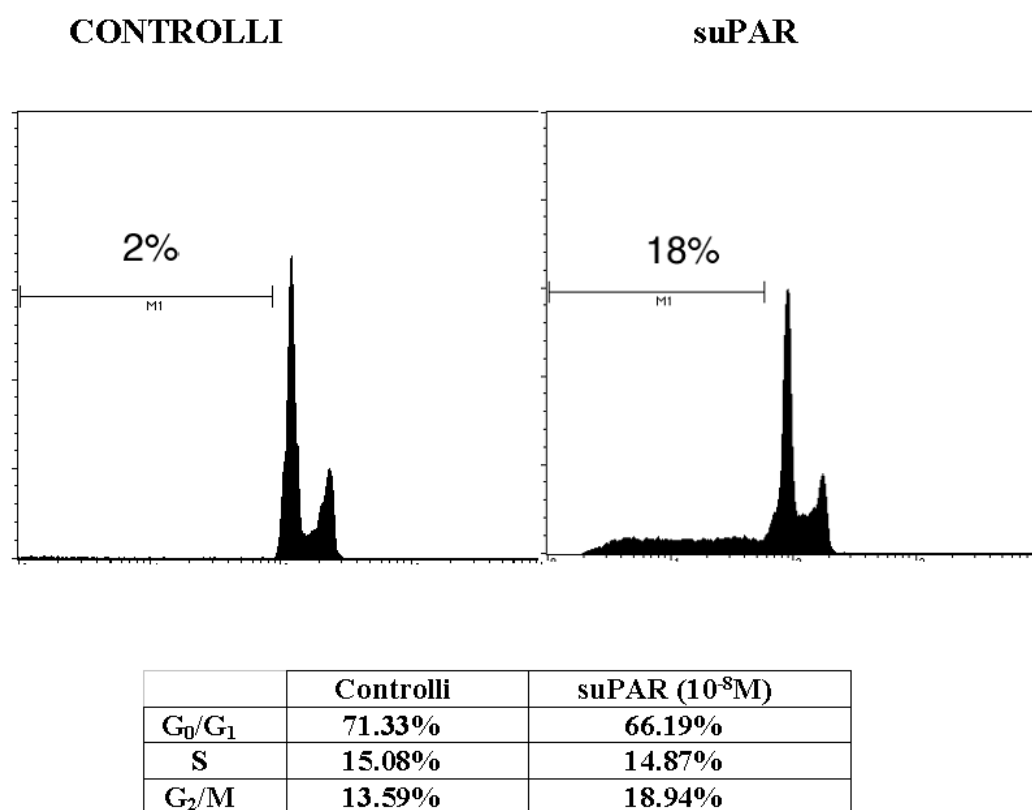


Figura 22: Effetto del trattamento di 24 ore con suPAR (10⁻⁸M) sulla proliferazione di cellule DU145. Analisi del ciclo cellulare tramite FACScan. Le cellule sono state contate con un FACScan flow cytometer con un laser all'argon con lunghezza d'onda di eccitazione di 488nm, quindi analizzate usando il software Cell Quest.

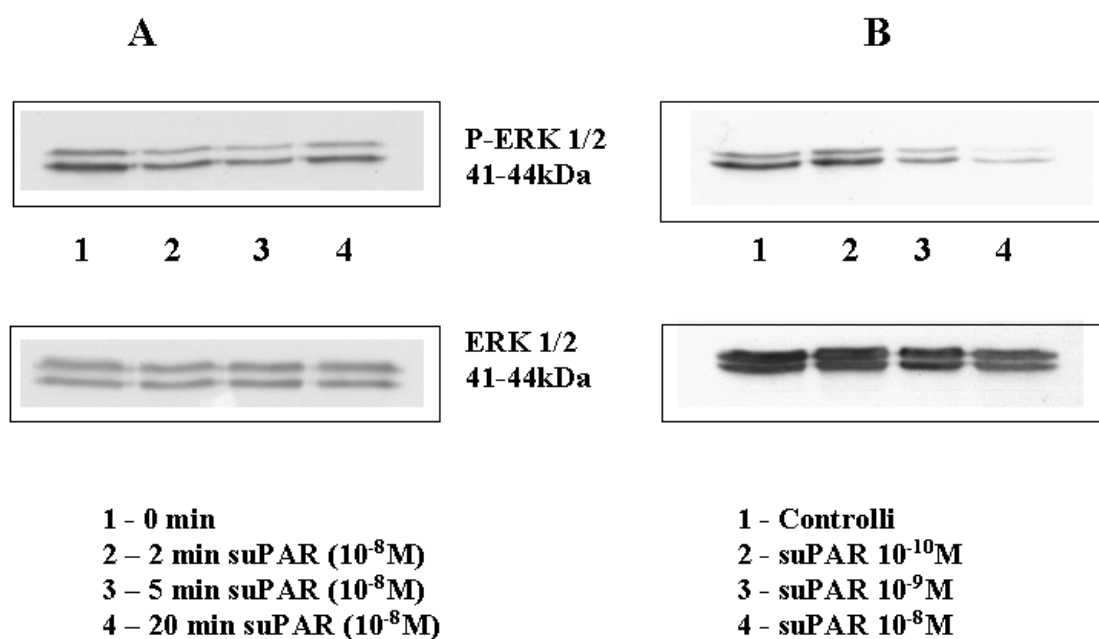


Figura 23: Effetto tempo-dipendente (pannello A) e dose-dipendente (pannello B) del trattamento con suPAR sulla fosforilazione di ERK1/2 in cellule DU145. Le cellule sono state piastrate in condizioni serum-free per 18 ore e, successivamente, trattate con suPAR (10^{-8} M) per 2, 5 e 20 minuti (pannello A). In una seconda serie di esperimenti le cellule DU145 sono state trattate per 5 minuti con dosi crescenti di suPAR (10^{-10} - 10^{-9} - 10^{-8} M) (pannello B). Gli estratti cellulari sono stati sottoposti ad analisi Western Blotting per determinare l'espressione di P-ERK1/2 ed ERK1/2 totale.

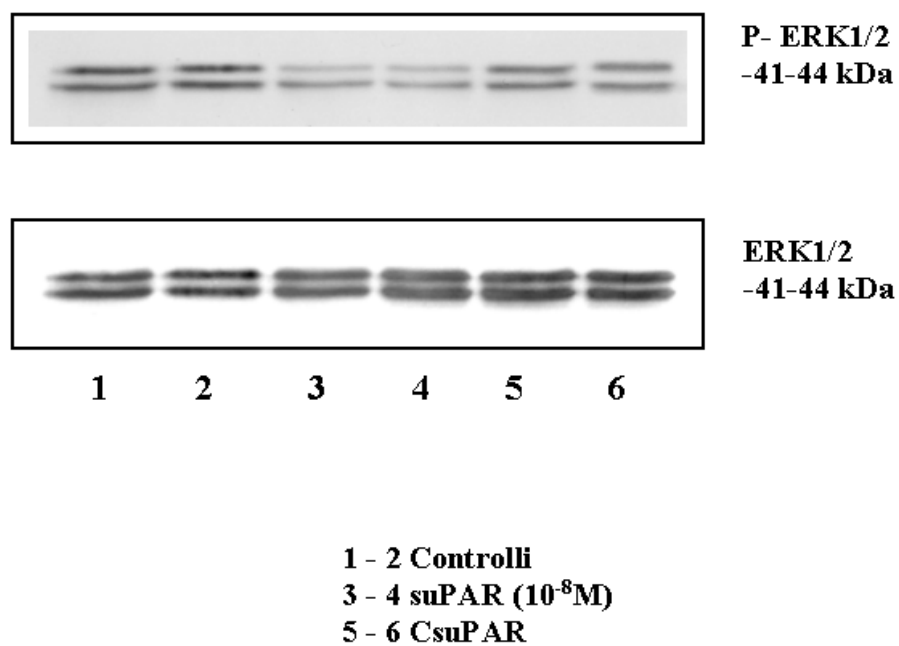


Figura 24: Effetto del trattamento con suPAR e CsuPAR sulla fosforilazione di ERK1/2 in cellule DU145. Il CsuPAR è stato preparato incubando il suPAR con la chimotripsina ($5\mu\text{g/mL}$) per 7 ore a 37°C . Le cellule DU145 sono state trattate con suPAR (10^{-8}M) e CsuPAR per 5 minuti. Gli estratti cellulari sono stati sottoposti ad analisi Western Blotting per determinare l'espressione di P-ERK1/2 ed ERK1/2 totale.

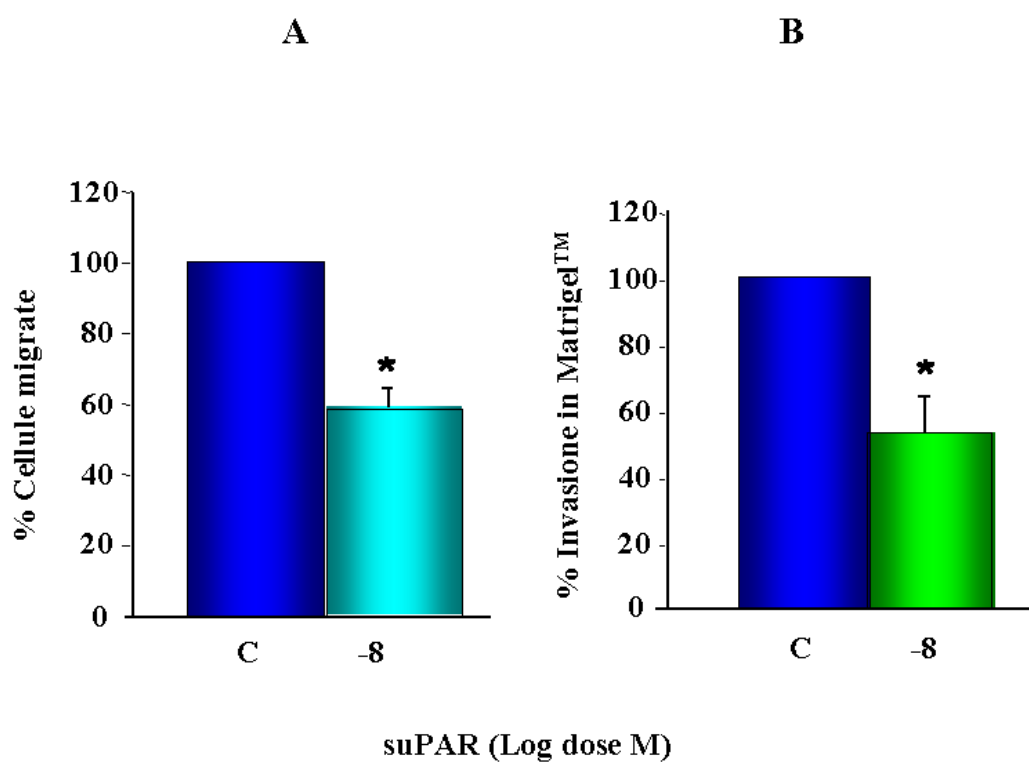


Figura 25: Effetto del trattamento (48 ore) con suPAR (10⁻⁸M) sull'aptotassi indotta da laminina (pannello A) e sull'invasione in Matrigel™ (pannello B), effettuato su cellule di CaP androgeno-indipendente DU145 in camera di Boyden e con Matrigel™ Invasion Test. I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica (*p<0.05 vs C, controlli).

BIBLIOGRAFIA

Achbarou A, Kaiser S, Tremblay G, Ste-Marie L-G, Brodt P, Goltzman D, Rabbani SA: Urokinase overproduction results in increased skeletal metastasis by prostate cancer cells in vivo, *Cancer Res* 1994; 54, 2372-2377

Aguirre-Ghiso JA, Kovalski K, Ossowski L: Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling, *J Cell Biol* 1999; 147, 89-104

Aguirre-Ghiso JA, Liu D, Mignatti A, Kovalski K, Ossowski L. Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK (MAPK) to p38 (MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo, *Mol Biol Cell*. 2001; 12, 863-769.

Akiri G, Nahari D, Finkelstein Y, Le SY, Elroy-Stein O, Levi BZ.. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* 1998. 17:227-236

Amanatullah DF, Reutens AT, Zafonte BT, Fu M, Mani S, Pestell RG: Cell-cycle dysregulation and the molecular mechanism of prostate cancer; *Frontiers in Bioscience* 2000; 5, 372-390

Amin W, Karlan BY, Littlefield BA: Glucocorticoid sensitivity of OVCA 433 human ovarian carcinoma cells: inhibition of plasminogen activators, cell growth, and morphological alteration, *Cancer Res* 1987; 47, 6040-6045

Andersson H, Tisell LE: Morphology of rat prostatic lobes and seminal vesicles alter long-term estrogen treatment, *Acta Pathol. Microbiol Immunol. Scand. [A]* 1982. 90 (6) 441-448.

Andolfo A, English WR, Rasnati M, et al.: Metalloproteases cleave the urokinase-type plasminogen activator receptor in the D1-D2 linker region and expose epitopes not present in the intact soluble receptor; *Thromb Haemost* 2002; 88, 298-306

Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ: The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review, *Int J Cancer* 1997; 72, 1-22

Bahk JY, Hyun JS, Lee H et al.: Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor mRNA in prostate cancer cells and effect of GnRH on the proliferation of prostate cancer cells, *Urol Res* 1998; 26, 259-264.

Balbay MD, Pettaway CA, Kuniyasu H, Inoue K, Ramirez E, Li E, Fidler IJ, Dinney CP: Highly metastatic human prostate cancer growing within the prostate of athymic mice overexpresses vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res.* 1999. 5:783-789.

Bardelli A, Longati P, Albero D, Goruppi S, Schneider C, Ponzetto C, Comoglio PM: HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *EMBO J.* 1996. 15, 6205-6212

Basset P, Okada A, Chenard MP, Kannan R, Stoll I, Anglard P et al.: Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications, *Matrix Biol* 1997; 15, 535-541

Beaufort N, Leduc D, Rousselle JC, et al.: Proteolytic regulation of the urokinase receptor/CD87 on monocytic cells by neutrophil elastase and cathepsin G; *J Immunol* 2004; 172, 540-549

Belis LA, Adlerstein LB, Tarry WF: Influence of estradiol on accessory reproductive organs in the castrated male rats. Effects of bromocriptine and flutamide, *J. Androl.* 1983. 4 144-149

Bentel J.M., Tilley W.D., Androgen receptor in prostate cancer. *J. Endocrinol.* 1996. 151, 1-11

Bianco JJ, Handelsman DJ, Pedersen JS, Risbridger GP: Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinology.* 2002. 143 4922-4933.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, Engler JA: Matrix metalloproteinases: a review, *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4, 197-250

Blasi F, Carmeliet P: uPAR: a versatile signalling orchestrator; *Molecular Cell Biology* 2002; 3, 932-942

Blasi F, Stoppelli MP: Proteases and cancer invasion: from belief to certainty, *Biochem Biophys Acta* 1998; 1423, R35-R44

Boccaccio C, Gaudino G, Gambarotta G, Galimi F, Comoglio PM: Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF. *J. Biol. Chem.* 1994. 269,12846-12851.

Bonaccorsi L., Carloni V., Muratori M., Salvatori A., Augusto G., Carini M., Serio M., Forti G., Baldi E. Androgen receptor expression in prostate carcinoma a4a6 integrin-mediated invasive phenotype. 2000. 141, 3172-3182

Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K: Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions. *Am. J. Pathol.* 1999. 155 (2) 641-647

Borgstrom P, Bourdon MA, Hillan KJ, Sriramaraio P, Ferrara N: Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. *Prostate.* 1998. 35:1-10.

Bosland MC: The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2000. 27 39-66

Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Chersesh DA: Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell.* 1994. 79:1157-1164.

Brunner N, Nielsen HJ, Hamers M, et al.: The urokinase plasminogen activator receptor in blood from healthy individuals and patients with cancer; *APMIS* 1999; 107; 160-167

Bubendorf L., Kononen J., Koivisto P. et al., Survey of gene amplification during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res.* 1999. 59, 803-806

Buchanan G., Greenberg N.M., Scher H.I. et al., Collocation of androgen receptor gene mutations prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2001a. 7, 1273-1281

Buchanan G., Irvine R.A., Coetzee G.A., Tilley W.D., Contribution of the androgen receptor to prostate cancer predisposition and progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2001b. 20, 207-223

Burgess WH, Dionne CA, Kaplow J, Mudd R, Friesel R, Zilberstein A, Schlessinger J& Jaye M: Characterization and cDNA cloning of phospholipase C-gamma, a major substrate for heparin-binding growth factor I(acidic fibroblast growth factor)-activated tyrosine kinase. *Molecular and Cellular Biology.* 1990. 10 4774-4777.

Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L., Gaudino G, Tamagnone L, Coffey A, Comoglio PM: Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J. Cell Biol.* 1992. 119, 629-641

Butzow R, Huhtaniemi I, Clayton R, Wahlstrom T, Anderson LC, Seppala M: Cultured mammary carcinoma cells contain gonadotropin-releasing hormone-like immunoreactivity, GnRH binding sites and chorionic gonadotropin, *Int J Cancer* 1987; 39, 498-501

Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaitre V, Tipping P et al.: Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation, *Nat Genet* 1997; 17, 439-444

Carrel RW, Stein PE: The biostructural pathology of the serpins: critical functions of sheet opening mechanism; *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1996; 377, 1-17

Castoria G., Lombardi M., Barone M.V. et al., Androgen- stimulated DNA synthesis and cytoskeletal changes in fibroblasts by a nontranscriptional receptor action. *J. Cell Biol.* 2003. 161, 547-556

Chambers AF: The metastatic process: Basic Research and clinical implications, *Oncol Res* 1990; 50, 6130-6138

Chatzaki E, Bax CMR, Eidne KA, Anderson L, Grudzinskas JG, Gallagher CJ: The expression of gonadotropin-releasing hormone and its receptor in endometrial cancer and its relevance as an autocrine growth factor, *Cancer Res* 1995; 56, 2055-2065.

Chen P, Xie H, Sekar MC, Gupta K, Welis A: Epidermal growth factor receptor-mediated cell motility: phospholipase C activity is required, but mitogen-activated protein kinase activity is not sufficient for induced cell movement. *J. Cell Biol.* 1994. 127, 847-857.

Chou CS, MacCalman CD, Leung PCK: Differential effects of gonadotropin-releasing hormone I and II on the urokinase-type plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor system in human decidual stromal cells in vitro, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003; 88 (8), 3806-3815

Chou CS, Zhu H, Shalev E, MacCalman CD, Leung PCK: The effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH I) and GnRH II on the urokinase-type plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor system in human extravillous cytotrophoblasts in vitro, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; 87 (12), 5594-5603

Ciambrone CJ, McKeown-Longo PJ: Plasminogen activator inhibitor type 1 stabilizes vitronectin-dependent adhesion in HT-1080 cells; *J Cell Biol* 1990; 111, 2183-2195

Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ: Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1996. 271:736-741.

Collen D: On the regulation of fibrinolysis; *Thromb Haemostasis* 1980; 43, 77-89

Cronauer MV, Hittmair A, Eder IE, Hobisch A, Culig Z, Ramoner R, Zhang J, Bartsch G, Reissigl A, Radmayr C, Thurnher M, Klocker H: Basic

fibroblast growth factor levels in cancer cells and in sera of patients suffering from proliferative disorders of the prostate. *Prostate*. 1997. 31 223--233

Crowly CW, Cohen RL, Liu G, Shuman MA, Levinson AD: Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor, *Proc Nat Acad Sci USA* 1993; 90, 5021-5025

Cubellis M.V., Nolli M.L., Cassani G., Blasi F.: Binding of single chain pro-urokinase to the urokinase receptor of human U937 cells, *J Biol Chem* 1986; 261: 15819-15822

Cubellis MV, Andreasen P, Ragno P, Mayer M, Dano K, Blasi F: Accessibility of receptor-bound urokinase to type-1 plasminogen activator inhibitor; *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86, 4828-4832

Culig Z, Hobisch A, Hittmair A, Peterziel H, Cato AC, Bartsch G, Klocker H: Expression, structure, and function of androgen receptor in advanced prostatic carcinoma, *Prostate* 1998; 35, 63-70

Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, Bartsch G, Klocker H: Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-1, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Research*. 1994. 54 5474-5478.

Czekay RP, Loskutoff DJ: Unexpected role of Plasminogen Activator Inhibitor 1 in cell adhesion and detachment; *Exp Biol Med* 2004; 229,1090-1096

Danø K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen K, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L: Plasminogen activators, tissue degradation and cancer, *Adv Cancer Res* 1985; 44, 139-266

Davies G, Jiang KG, Mason MD: Cell-cell adhesion molecules and signalling intermediates and their role in the invasive potential of prostate cancer cells. *J. Urol*. 2000. 163, 985-992.

Debes JD, Sebo TJ, Lohse CM, Murphy LM, Haugen de AL, Tindall DJ: p300 in prostate cancer proliferation and progression. *Cancer Research*. 2003. 63 7638-7640.

De la Monte SM, Moore GW, Hutchins GM: Metastatic behavior of prostate cancer. Cluster analysis of patterns with respect to estrogen treatment. *Cancer (Phila.)* 1986. 58: 985-993

Deo DD, Axelrad TW, Robert EG, Marcheselli V, Bazan NG, Hunt JD: Phosphorylation of STAT-3 in response to basic fibroblast growth factor occurs through a mechanism involving platelet-activating factor, JAK-2, and Src in human umbilical vein endothelial cells. Evidence for a dual kinase mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 2002. 277 21237-21245.

De Paulis A, Montuori N, Prevete N, et al.: Urokinase induces basophil chemotaxis through a urokinase receptor epitope that is an endogenous ligand for FPRL1 and FPRL2; *J Immunol* 2004; 173, 5739-5748

De Primo S.E., Diehn M., Nelson J.B. et al., Transcriptional programs activated by exposure of human prostate cancer cells to androgen. *Genome Biol.* 2002. 3, 32

DeVere RW, White, Hackman RM, Soares SE, Beckett LA, Li Y, Sun B: Effects of a genistein-rich extract on PSA levels in men with a history of prostate cancer. *Urology.* 2004. 63 (2) 259-263

Deng G, Curriden SA, Wang S, Rosenberg S, Luskutoff DJ: Is plasminogen inhibitor-1 the molecular switch that governs the urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J Cell Biol* 1996a; 134, 1563-1571

Deng G, Royle G, Wang S, Crain K, Loskutoff DJ: Structural and functional analysis of the plasminogen activator inhibitor-1 binding motif in the somatomedin B domain of vitronectin; *J Biol Chem* 1996b. 271, 12716-12723

Deroanne CF, Hajitou A, Calberg-Bacq CM, Nusgens BV, Lapiere CM: Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* 1997. 57:5590-5597.

Di Sant'Agnese PA, De Mesy Jensen KL: Somatostatin and/or somatostatin-like immunoreactive endocrine-paracrine cells in the human prostate gland. 1984. *Arch Pathol Lab Med.* 108(9): 693-6.

Dizeyi N, Konrad L, Bjartell A: Localization and mRNA expression of somatostatin receptor subtypes in human prostatic tissue and prostate cancer cell lines, *Urol. Oncol.* 2002. 7 91-98

Dondi D, Limonta P, Moretti RM, Montagnani Marelli M, Garattini E, Motta M: Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists on human androgen-independent prostate cancer cell line DU145: evidence for an autocrine inhibitory LHRH loop, *Cancer Res* 1994; 54, 4091-4095

Dondi D, Moretti RM, Montagnani Marelli M et al.: Growth inhibitory effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists on xenografts of the DU145 human androgen-independent prostate cancer cell line in nude mice, *Int J Cancer* 1998; 76, 506-511

Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ: Macrophage-derived metalloelastases is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma, *Cell* 1997; 88, 801-810

Dorkin TJ, Robinson MC, Marsh C, Neal DE, Leung HY: aFGF immunoreactivity in prostate cancer and its co-localization with bFGF and FGF8. *Journnl of Pathology* 1999a. 189 564-569.

Dorkin TJ, Robinson MC, Marsh C, Bjartell A, Neal DE, Leung HY: FGF8 over-expression in prostate cancer is associated with decreased patient survival and persists in androgen independent disease. *Oncogene*. 1999b. 18 2755-2761.

Duffy MJ, Duggan C: The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer, *Clinical Biochemistry* 2004; 37, 541-548

Dunnet C.W.: A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, *J Am Stat Assoc* 1955; 50: 1096-1121

Dunsmore SE, Rubin JS, Kovacs So, Chedid M. Parks WC, Welgus HG: Mechanisms of Hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production. *J. Biol. Chem.* 1996. 271, 24567-24582

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis, *Am J Pathol* 1995; 146, 1029-1039.

El-Badry OM, Minniti C, Kohn EC, Houghton PJ, Daughaday WH, Helman LJ: Insuline-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors, *Cells Growth Differ* 1990; 1, 325-31

Emons G, Ortmann O, Shulz K-D, Schally AV: Growth-inhibitory actions of analogues of luteinizing hormone-releasing hormone on tumor cells, *Trends Endocrinol Metab* 1997; 8, 355-362

Emons G, Ortmann O, Shulz K-D: GnRH analogues in ovarian, breast and endometrial cancers, In: *GnRH Analogues: The State of the Art*. Parthenon Publishing Group, Camforth, UK 1996; pp 13-26

Emons G, Schally AV: The use of luteinizing hormone-releasing hormone agonists and antagonists in gynecological cancers, *Hum Reprod* 1994; 9, 1364-1379

Emons G, Weiss S, Ortmann O, Gründker C, Schulz K-D: LHRH might act as a negative autocrine regulator of proliferation of human ovarian cancer, *Eur J Endocrinol* 2000; 142, 665-670

Feinberg RF, Kao LC, Haimowitz JE, Queenan JT Jr, Wun TC, Strauss JF 3rd, Kliman HJ: Plasminogen activator inhibitor types 1 and 2 in human trophoblasts. PAI-1 is an immunocytochemical marker of invading trophoblasts. *Lab Invest*. 1989. 61(1):20-6

Feng D, Nagy JA, Brekken RA, Pettersson A, Manseau EJ, Pyne K, Mulligan R, Thorpe PE, Dvorak HF, Dvorak AM: Ultrastructural localization of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) receptor-2 (FLK-1, KDR) in normal mouse kidney and in the hyperpermeable vessels induced by VPF/VEGF-expressing tumors and adenoviral vectors. *J Histochem Cytochem.* 2000. 48:545-556.

Fernebro E, Madsen RR, Ferno M, Brunner M, Bendahl P, Christensen IJ, Johnson A, Nilbert M: Prognostic importance of the soluble plasminogen activator receptor, suPAR, in plasma from rectal cancer patients; *Eur J Cancer* 2001; 37, 486-491

Ferro MA: Use of intravenous stilbestrol diphosphate in patients with prostatic carcinoma refractory to conventional hormonal manipulation. *Urol. Clin. North Am.* 1991. 18: 139-143

Festuccia C, Dolo V, Guerra F, Violini S, Muzi P, Pavan A, Bologna M: Plasminogen activator system modulates invasive capacity and proliferation in prostatic tumor cells, *Clin Exp Metastasis* 1998; 16, 513-528

Festuccia C, Vicentini C, Firma N, Pasquale ABD, Aceto G, Zazzeroni F, Miano L, Bologna M: Plasminogen activator activities in short-term tissue culture of benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Oncol Res.* 1995. 7: 131-138

Fidler IJ: Critical factors in the biology of human cancer metastasis: Twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture, *Cancer Res* 1990; 50, 6130-6138

Fidler IJ: Angiogenic heterogeneity: Regulation of neoplastic angiogenesis by the organ microenvironment. *J Natl Cancer Inst.* 2001. 93:1040-1041.

Finkenzeller G, Marme D, Weich HA, Hug H: Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C. *Cancer Res.* 1992. 52:4821-4823.

Fischer J, Palmedo G, von Knobloch R, Bugert P, Prayer-Galetti T, Pagano F, Kovacs G: Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene.* 1988. 17, 733-739.

Flanagan CA, Becker II, Davidson JS, Wakefield IK, Zhou W, Sealfon SC, Millar RP, *J Biol Chem* 1994; 269, 22636-22641

Floridon C, Nielsen O, Holund B, Sunde L, Westergaard JG, Thomsen SG, Teisner B: Localisation and significance of urokinase plasminogen activator and its receptor in placental tissue from intrauterine, ectopic and molar pregnancies, *Placenta* 1999; 20, 711-721

Folkman J: The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol.* 1992. 3:65-71.

Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science.* 1987. 235:442-447.

Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D: Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature.* 1989. 339:58-61.

Fujimoto J, Hori M, Ichigo S, Tamaya T: Sex steroids regulate the expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and its mRNA in uterine endometrial cancer cell line Ishikawa, *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996; 59 (1), 1-8

Garcia-Monco JC, Coleman JL, Benach JL: Soluble urokinase receptor (uPAR, CD 87) is present in serum and cerebrospinal fluid in patients with neurologic diseases; *J Neuroimmunol* 2002; 129, 216-223

Geller J, Vik Franson A: Endocrine dependent prostate disease, Serio M, eds *Perspectives in Andrology.* New York: Raven Press 1989.

Gherardi E, Stoker M: Hepatocyte growth factor-scatter factor: mitogen, motogen and met, *Cancer Cells* 1991; 3, 227-32

Giancotti FG, Mainiero F: Integrin-mediated adhesion and signalling in tumourgenesis. *Biochem. Biophys. Acta.* 1994. 1198, 4-64.

Gils A, Declercq PJ: Structure-function relationships in serpins: current concepts and controversies, *Thromb Haemostasis* 1998; 80, 531-541

Giraudo E, Primo L, Audero E, Gerber HP, Koolwijk P, Soker S, Klagsbrun M, Ferrara N, Bussolino F: Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998. 273:22128-22135.

Giri D, Ittmann M: Interleukin-8 is a paracrine inducer of fibroblast growth factor 2, a stromal and epithelial growth factor in benign prostatic hyperplasia. *American Journal of Pathology.* 2001. 159 139-147.

Giri D, Ropiquet F, Ittmann M: Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clinical Cancer Research.* 1999a. 5 1063-1071.

Goodson RJ, Doyle MV, Kaufman SE, Rosenberg S: High affinity urokinase receptor antagonists identified with bacteriophage peptide display, *PNAS* 1994; 91, 7129-7133

Griffiths K: International Prostate Health Council Study Group, Estrogens and prostatic cancer, *Prostate.* 2000. 45 87-100

Grossmann M.E., Huang H., Tindall D.J., Androgen receptor signalling in androgen refractory prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001. 93, 1687-1697

Gründker C, Günthert AR, Westphalen S, Emons G: Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers, *European Journal of Endocrinology* 2002; 146, 1-14

Gründker C, Völker P, Emons G: Antiproliferative Signaling of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in Human Endometrial and Ovarian Cancer Cells through G Protein α -Mediated Activation of Phosphotyrosine Phosphatase, *Endocrinology* 2000; 142, 2369-2380.

Grünwald Viktor, Hidalgo Manuel: Developing Inhibitors of the Epidermal Growth Factor Receptor for Cancer Treatment, *Journal of the National Cancer Institute* 2003; 95, 851-867.

Grzymil M. et al.: Blockage of the type I IGF receptor expression in human prostate cancer cells inhibits proliferation and invasion, up-regulates IGF binding protein-3, and suppresses MMP-2 expression. *J. Pathol.* 2004. 202, 50-59

Guerriero J, Santibaez J F, Gonzalez A, Martinez J: EGF receptor transactivation by urokinase receptor stimulus through a mechanism involving Src and matrix metalloproteinases, *Experimental Cell Research* 2004; 292, 201-208.

Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C: Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells, *J Biol Chem* 1997; 272, 24-27

Hadari YR, Gotoh N, Kouhara H, Lax I, Schlessinger J: Critical role for the docking-protein FRS2 α in FGF receptor-mediated signal transduction pathways. *PNAS.* 2001. 98 8578-8583.

Halmos G, Schally AV, Sun B, Davis R, Bostwick DG, Plonowski A: High expression of somatostatin receptors and mRNA for its receptor subtypes in organ-confined and locally advanced human prostate cancer, *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85, 2564-2571

Hammond G.L., Avvakumov G.V., Muller Y.A., Structure/function analyses of human sex hormone-binding globulin: effects on zinc on steroid-binding specificity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003. 85, 195-200

Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell* 1996; 86, 353-364

Hansson J, Bjartell A, Gadaleanu V: Expression of somatostatin receptor subtypes 2 and 4 in human benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer, *Prostate.* 2002. 53 50-59.

Härkönen P: Paracrine prolactin may cause prostatic problems. *Endocrinology*. 2003. 144 2266-2268

Harris SE, Harris M, Mahymwozney I, Feng J, Mundy GR: Expression of bone morphogenetic proteins by normal rat and human prostate cancer cells, *The Prostate* 1994; 24, 204-11

Hart KC, Robertson SC, Donoghue DJ: Identification of tyrosine residues in constitutively activated fibroblast growth factor receptor 3 involved in mitogenesis, Stat activation, and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Molecular and Cellular Biology*. 2001. 12 931-942.

Hartley-Asp B, Gunnarsson PO: Growth and cell survival following treatment with wxtramustine nor-nitrogen mustard, estradiol and testosterone of a human prostatic cancer cell line (DU145); *J Urol* 1982; 127, 818-822

Heinert G, Kirchheimer JC, Plfuger H, Binder BR: Urokinase-type plasminogen activator as a marker for the formation of distant metastases in prostatic carcinomas. *J Urol*. 1988. 140:1466-1469

Hejna M, Schmidinger M, Raderer M: The clinical role of somatostatin analogues as antineoplastic agents, *Ann. Oncol*. 2002. 13 653

Henderson BE, Feigelson HS: Hormonal carcinogenesis, *Carcinogenesis*. 2000. 21 427-433.

Henderson J, Shustik C, Kremer R, Rabbani SA, Hendy GN, Goltzman D: Circulating concentration of parathyroid hormone-like peptide in malignancies and in hyperparathyroidism, *J Bone Miner Res* 1990; 5, 105-13

Hierowski MT, Schally AV: An inhibitor of urokinase and tissue plasminogen activators in Dunning R3327H prostate tumors of rats treated with D-Trp6-LH-RH, *Horm Res* 1985; 21 (2), 124-35

Hiscox S, Jiang WG: HGF/SF regulates the phosphorylation of β -catenin and cell-cell adhesion in cancer cells. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1998. 139, 500-501.

Hoosein NM, Boyd DD, Hollas WJ, Mazar A, Henkin J, Chung LW: Involvement of urokinase and its receptor in the invasiveness of human prostatic carcinoma cell lines. *Cancer Commun*. 1991. 3(8):255-64

Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Head DR, Quinn DT, Mäkela S, Delprado W, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill G, Kooner R, Stricker PD, Grygiel JJ, Gustafsson JA, Sutherland RL: Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer. *Cancer Res*. 2001. 61 (14) 5331-5335.

Høyer-Hansen G, Ploug M, Behrendt N, Rønne E, Danø K: Cell-surface acceleration of urokinase-catalyzed receptor cleavage, *Eur J Biochem* 1997; 243, 21-26

Høyer-Hansen G, Rønne E, Solberg H, Behrendt N, Ploug M, Lund RL, Ellis V, Danø K: Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain, *J Biol Chem* 1992; 267, 18224-18229

Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Itangnekar VM, Chen CS: The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem*. 2000. 275:11397-11403.

Humphrey PA, Zhu X, Zarnegar R, Swanson PE, Ratliff TL, Volimer RT, Day ML: Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma. *Am. J. Pathol.* 1995. 147, 386-396.

Illing N, Troskie BE, Nahorniak CS, Hapgood JP, Peter RE, Millar RP: Two gonadotrophin-releasing hormone receptor subtypes with distinct ligand selectivity and differential distribution in brain and pituitary in the goldfish (*Carassius Auratus*), *PNAS* 1999; 96, 2526-2531

Imai A, Ohno T, Iida K, Fuseya T, Furui T, Tamaya T: Presence of gonadotropin-releasing hormone receptor and its messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma and endometrium, *Gynecol Oncol* 1994; 55, 114-118

Imai A, Tamaya T: GnRH receptor and apoptotic signalling, *Vit Horm* 2000; 59, 1-33

Irmer G, Burger C, Muller R et al.: Expression of the messenger RNAs for luteinizing hormone-releasing (LHRH) and its receptor in human ovarian epithelial carcinoma, *Cancer Res* 1995; 55, 817-822

Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, Ricciardelli C, Stahl J, Choong C, Horsfall DJ, Tilley WD: A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res*. 2002. 62:854-859.

Jain RK, Safabakhsh N, Sckell A, Chen Y, Jiang P, Benjamin L, Yuan F, Keshet E: Endothelial cell death, angiogenesis, and microvascular function after castration in an androgen-dependent tumor: Role of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998. 95:10820-10825.

Jarred RA, McPherson SJ, Bianco JJ, Couse JF, Korach KS, Risbridger GP: Prostate phenotypes in estrogen-modulated transgenic mice. *Trends Endocrinol. Met.* 2002. 13 163-168.

Jenster J: The role of the androgen receptor in the development and progression of prostate cancer, *Semin Oncol* 1999; 26, 407-421

Jiang W, Hiscox S, Matsumoto K, Nakamura T: Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer. *Crit. Rev. Oncol.-Hematol.* 1999. 29, 209-248.

Jo M, Thomas KS, O'Donnell DM, Gonias SL. Epidermal growth factor receptor-dependent and -independent cell-signaling pathways originating from the urokinase receptor, *J Biol Chem* 2003a 17; 278 (3), 1642-6

Jo M, Thomas KS, Wu L, Gonias SL: Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits cancer cell growth and invasion by direct urokinase-independent effects on cell signalling; *The Journal of Biological Chemistry* 2003b; 47, 46692-46698

Johansson N, Ahonen M, Kahari VM: Matrix metalloproteinases in tumor invasion, *Cell Mol Life Sci* 2000; 57, 5-15

Johnson DE, Williams LT: Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Advances in Cancer Research.* 1993. 60 1-41.

Joseph IB, Isaacs JT: Potentiation of the antiangiogenic ability of linomide by androgen ablation involves down-regulation of vascular endothelial growth factor in human androgen-responsive prostatic cancers. *Cancer Res.* 1997. 57:1054-1057.

Jungwirth A, Pinski J, Galvan G et al.: Inhibition of growth of androgen-independent DU-145 prostate cancer in vivo by luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix and bombesin antagonists RC-3940-II and RC-3950-II, *Eur J Cancer* 1997; 33, 1141-1148

Kahari V.M., Saarialho-Kere U.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion, *Ann Med* 1999; 31: 34-45

Kahari VM, Saarialho-Kere U: Matrix metalloproteinases in skin, *Exp Dermatol* 1997; 6, 199-213.

Kaighn ME, Shankar Narayan K, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW: Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC3), *Invest Urol* 1979; 17, 16-23

Kaiser UB, Conn PM, Chin WW: Studies of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines, *Endocr Rev* 1997; 18, 46-70

Kakar SS, Grizzle WE, Neill JD: The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary, *Mol Cell Endocrinol* 1994; 106, 145-149

Kalra SP: Mandatory neuropeptide-steroid signalling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge, *Endocr Rev* 1993; 14, 507-538

Karande AA, Rajeshwari K, Schol DJ, Hilgers JHM: Establishment of immunological probes to study human gonadotropin-releasing hormone receptors, *Mol Cell Endocrinol* 1995; 114, 51-56

Ke SH, Coombs GS, Tachias K, Corey DR, Madison EL: Optimal subsite occupancy and design of a selective inhibitor of urokinase; *J Biol Chem* 1997; 272, 20456-20462

Keri G, Balogh A, Szoke B, Teplan I, Csuka O: Gonadotropin-releasing hormone analogues inhibit cell proliferation and activate signal transduction pathways in MDA-MB-231 human breast cancer cell line, *Tumor Biol* 1991; 12, 61-67

Kim KY, Choi KC, Park SH, Auersperg N, Leung PC: Extracellular signal-regulated protein kinase, but not c-Jun N-terminal kinase, is activated by type II gonadotropin-releasing hormone involved in the inhibition of ovarian cancer cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005. 90(3):1670-7

King JA, Millar RP: GnRH neurones: gene to behaviour. Eds Parhar I e Sakuma Y (*Brain Shuppan*, Tokyo), 1997; pp 51-77

Kirchheimer J.C., Koller A., Binder B.R.: Isolation and characterization of plasminogen activators from hyperplastic and malignant prostate tissue, *Biochim Biophys Acta* 1984; 797: 256-60

Kjøller L, Hall A: Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin, *J Cell Biol* 2001; 152, 1145-1157

Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammelle T, Hyytinen E, Isola J, Trappman J, Cleutjens K, Noordzij A, Visakorpi T, Kallioniemi OP: Androgen receptor gene amplification: A possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer, *Cancer Res* 1997; 57, 314-319

Kollara A, et al.: Secretion of endogenous kallikreins 2 and 3 by androgen receptor-transfected PC-3 prostate cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003. 84, 493-502

Kottler ML, Starzec A, Carre MC, Lagarde JP, Martin A, Counis R: The genes for gonadotropin-releasing hormone and its receptor are expressed in human breast with fibrocystic disease and cancer, *Int J Cancer* 1997; 71, 595-599

Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI et al.: Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell.* 2001; 104, 719-730

Kousteni S, Hans L, Chen JR et al.: Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J. Clin. Invest.* 2003; 111, 1651-1664

Koutsilieris M. et al.: Insulin-like growth factor I and urokinase-type plasminogen activator bioregulation system as a survival mechanism of prostate cancer cells in osteoblastic metastases: development of anti-survival factor therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Mal. Med.* 2000. 6, 251-267

Krill D, Shuman M, Thompson MT, Becich MJ, Strom SC: A simple method for the isolation and culture of epithelial and stromal cells from benign and neoplastic prostates. *Urology.* 1997. 49, 981-988.

Krüger A, Soeltl R, Lutz V, Wilhelm OG, Magdolen V, Rojo EE, Hantzopoulos PA, Graeff H, Gansbacher B, Schmitt M: Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87), *Cancer Gene Ther.* 2000; 7, 292-299.

Kurimoto S, Moriyama N, Horie S, Sakai M, Kameyama S, Akimoto Y, Hirano H, Kawabe K: Co-expression of hepatocyte growth factor and its receptor in human prostate cancer. *Histochem. J.* 1998. 27-32

Kwabi-Addo B, Wang J, Erdem H, Vaid A, Castro P, Ayala G, Ittmann M: Expression of Sproutyl, an inhibitor of fibroblast growth factor signal transduction, is decreased in human prostate cancer. *Cancer Research.* 2004. 64 4728-4735.

Kwabi-Addo B, Ropiquet F, Giri D, Ittmann M: Alternative splicing of fibroblast growth factor receptors in human prostate cancer. *Prostate.* 2001. 46 163-172.

Lamb DJ, Weigel NL, Marcelli M: Androgen receptors and their biology. *Vitam. Horm.* 2001; 62, 199-230

Lamberts SW, van der Lely AJ: New somatostatin analogs: will they fulfill old promise?, *Eur. J. Endocrinol.* 2002. 146 701-705

Lamberts SW, de Herder WW, Hofiand LJ: Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 2002. 13 451-455

Lane KE, Leav I, Ziar J, Bridges RS, Rand WM, Ho SM: Suppression of testosterone and estradiol-17beta-induced dysplasia in the dorsolateral prostate of noble rats by bromocriptine. *Carcinogenesis.* 1997. 18 1505-1510

Latil A, Bieche L, Vidaud D, Lidercau R, Berthon P, Cussenot O, Vidaud M: Evaluation of androgen, estrogen (ER α and ER β), and progesterone receptor expression in human prostate cancer by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Cancer Res.* 2001; 61, 1919-1926

Lau HK, Kim M: Soluble urokinase receptor from fibrosarcoma HT-1080 calls; Blood Coagul Fibrinolysis 1994; 5, 473-478

Lau KM, LaSpina M, Long J, Ho SM: Expression of estrogen receptor (ER)- α and ER β in normal and malignant prostatic epithelial cells regulation by methylation and involvement in growth regulation. Cancer Res. 2000. 60: 3175-3182

Le Y, Murphy MP, Wang JM: Formyl-peptide receptors revisited; Trends Immunol 2002; 23, 541-548

Leav, Lau KM, Adams LY, McNeal JE, Taplin ME, Wang J, Singh H, Ho SM: Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. Am. J. Pathol. 2001. 159 (1) 79-92.

Lee M, Gomez SL, Chang JS, Wey M, Wang RT, Hsing AW: Soy and isoflavone consumption in relation to prostate cancer risk in China. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2003. 12 (7) 665-668

LeRoith D: The insulin-like growth factor system and cancer. Cancer Lett. 2003. 195, 127-137

Levy AP, Levy NS, Goldberg MA: Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. J Biol Chem. 1996. 271:2746-2753.

Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, Lee ME: Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. J Biol Chem. 1995. 270:308-312.

Li X, Nokkala E, Yan W, Streng T, Saarinen N, Warri A, Huhtaniemi I, Santti R, Makela S, Poutanen M: Altered structure and function of reproductive organs in transgenic male mice overexpressing human aromatase. Endocrinology. 2001. 142 2435-2442

Li L, et al.: Relation of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 to risk of prostate cancer. Cancer Causes Control. 2003. 14, 721-726

Lijnen HR, Ugwu F, Bini A, Collen D: Generation of angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3), Biochemistry 1998a; 37: 4699-4702

Lijnen HR, Van Hoef B, Lupu F, Carmeliet P, Collen D: Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes; Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998b; 18, 1035-1045

Limonta P, Dondi D, Moretti RM, Fermo D, Garattini E, Motta M: Expression of luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the human prostatic cancer cell line LNCaP, *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76, 797-800

Limonta P, Dondi D, Moretti RM, Maggi R, Motta M: Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists on the human prostatic cancer cell line LNCaP, *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75, 207-212

Limonta P, Moretti RM, Montagnani Marelli M, Dondi D, Parenti M, Motta M: The luteinizing hormone-releasing hormone receptor in human prostate cancer cells: messenger ribonucleic acid expression, molecular size and signal transduction pathway, *Endocrinology* 1999; 140; 5250-5256

Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Motta M: The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol.* 2003. 24 (4): 279-95

Limonta P, Montagnani Marelli M, Moretti RM: LHRH analogues as anticancer agents: pituitary and extrapituitary sites of action. *Expert Opin Investig Drugs.* 2001. 10(4):709-720

Limonta P, Pratesi G, Moretti RM, Montagnani Marelli M, Motta M, Dondi D: Comments on inhibition of growth of androgen-independent DU-145 prostate cancer in vivo by luteinising hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix and bombesin antagonists RC-3940-II and RC-3950-II, Jungwirth et al., *Eur J Cancer* 1997, 33(7), 1141-1148. *Eur J Cancer.* 1998. 34(7):1134-6

Lin CY, Anders J, Johnson M, Sang QA, Dickson RB: Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity. *J. Biol. Chem.* 1999. 274, 18231-18236

Linja MJ, Savinainen KJ, Tammela TLJ, Isola LJ, Visakorpi T: Expression of ERa and ERb in prostate cancer. *Prostate.* 2003. 55 180-186

Liotta LA: Tumor invasion and metastasis-role of the extracellular matrix, *Cancer Res* 1986; 46, 1-7.

Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG: Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* 1991. 64:327-336

Litvinov I.V., De Marzo A.M., Isaacs J.T., Is the Achilles' heel for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88, 2972-2982

Liu D, Ghiso JA, Estrada Y, Ossowski L: EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma, *Cancer Cell* 2002; 1, 445-457

Loop SM, Gorder CA, Lewis SM, Saiers JH, Drivdahl RH, Ostenson RC: Growth inhibition of human prostatic cancer cells by an agonist of gonadotropin-releasing hormone, *Prostate* 1995; 26, 179-188

Lutz V, Reuning U, Kruger A, Luther T, von Steinburg SP, Graeff H, Schmitt M, Wilhelm OG, Magdolen V. High level synthesis of recombinant soluble urokinase receptor (CD87) by ovarian cancer cells reduces intraperitoneal tumor growth and spread in nude mice. *Biol Chem.* 2001. 382 789-798

Lyon PB, See WA, Xu Y, Cohen MB: Diversity and modulation of plasminogen activator activity in human prostate-carcinoma cell lines. *Prostate.* 1995. 27:179-186

Madaan S, Abel PD, Chaudhary KS, Hewitt R, Stott MA, Stamp GW, Lalani EN: Cytoplasmic induction and over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate cancer: Implications for prevention and treatment. *BJU Int.* 2000. 86:736-741.

Magdolen V, Kruger A, Sato S, Nagel J, Sperl S, Reuning U, Rettenberger P, Magdolen U, Schmitt M: Inhibition of tumor-associated urokinase-type plasminogen activator system: effects of high-level synthesis of soluble urokinase receptor in ovarian and breast cancer cells in vitro and in vivo; *Recent results Cancer Res* 2003; 162, 43-63

Mahabeleshwar GH, Das R, Kundu GC: Tyrosine Kinase, p56lck-induced Cell Motility, and Urokinase-type Plasminogen Activator Secretion Involve Activation of Epidermal Growth Factor Receptor/Extracellular Signal Regulated Kinase Pathways; *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279, 9733-9742

Mäkelä S, Pylkkanen LH, Santti RS, Adlercreutz H: Dietary soybean may be antiestrogenic in male mice. *J. Nutr.* 1995. 125 (3) 437-445

Mamoune A, Kassis J, Kharait S, Kloeker S, Manos E, Jones D A, and Wells A: DU145 human prostate carcinoma invasiveness is modulated by urokinase receptor (uPAR) downstream of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling, *Experimental Cell Research* 2004; 299, 91-100.

Mangel WF, Toledo DL, Nardulli AM, Reiner GC, Norman MJ, Katzenellenbogen BS: Plasminogen activates in human breast cancer cell hormonal regulation and properties; *Steroid Biochem Molec Biol* 1988; 30, 79-88

Mansson PE, Adams P, Kan M, McKeehan WL: HBGF1 gene expression in normal rat prostate and two transplantable rat prostate tumor, *Cancer Res* 1989; 49, 2485-94

Mars WM, Kim TH, Stolz DB, Liu ML, Michalopoulos GK: Presence of urokinase in serum-free primary rat hepatocyte cultures and its role in activating hepatocyte growth factor. *Cancer Res.* 1996. 56, 2837-2843.

Martikainen P, Härkönen P, Vanhala T, Makelà M, Viljanen M, Suominen J: Multihormonal control of synthesis and secretion of prostatein in cultured rat ventral prostate, *Endocrinology.* 1987. 121 604-611

Matrisian LM: The matrix-degrading metalloproteinases; *Bioessays* 1992; 14, 455-463

Mazure NM, Chen EY, Yeh P, Laderoute KR, Giaccia AJ: Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* 1996. 56:3436-3440.

Mazzeri R, Blasi F: The urokinase receptor and the regulation of cell proliferation. *Thromb Haemost.* 2005. 93: 641-646

McCabe NP, Angwafo FF 3rd, Zaher A, Selman SH, Kouinche A, Jankun J. Expression of soluble urokinase plasminogen activator receptor may be related to outcome in prostate cancer patients. *Oncol Rep.* 2000; 7, 879-882

McDonnell S, Navre M, Coffrey RJ Jr, Matrisian LM: Expression and localisation of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP-7) in human gastric and colon carcinomas, *Mol Carcinog* 1991; 4, 527-533

Meikle AW, Smith JA, Stringham JD: Production clearance and metabolism of testosterone in men with prostate cancer; *Prostate* 1987; 10, 25-31

Mehta PB, Robson CN, Neal DE, Leung HY: Serum keratinocyte growth factor measurement in patients with prostate cancer. *Journal of Urology.* 2000a. 164 2151-2155.

Mentor-Marcel R, Lamartiniere CA, Eltoum LE, Greenberg NM, Elgavish A: Genistein in the diet reduces the incidence of poorly differentiated prostatic adenocarcinoma in transgenic mice (TRAMP). *Cancer Res.* 2001. 61 (18) 6777-6782.

Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M et al.: Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor α -Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J.* 2000; 19, 5406-5417

Mignatti P, Rifkin DB: Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion, *Physiol Rev* 1993; 73, 161-195

Millar RP, Lowe S, Conklin D, Pawson A, Maudsley S, Troskie B, Ott T, Millar M, Lincoln G, Sellar R, Faurholm B, Scobie G, Kuestner R, Terasawa E, Katz A: A

novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. PNAS 2001; 98, 9636-9641

Miller WR, Scott WN, Morris R, Fraser HM, Sharpe RM: Growth of human breast cancer cells inhibited by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist, Nature 1985; 313, 231-233

Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S: Elevation of serum levels of urokinase-type plasminogen activator and its receptor is associated with disease progression and prognosis in patients with prostate cancer, Prostate 1999; 39, 123-129

Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura N: Activation of hepatocyte growth factor in the injured tissues is mediated by hepatocyte growth factor activator. J. Biol. Chem. 1996. 271, 3615-3618

Moghul A, Lin L, Beedle A, Kanbour-Shakir A, DeFrances MC, Liu Y, Zarnegar R: Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones: evidence for rapid decay of the 8 kb c-MET transcript. Oncogene 1994. 9, 2045-2052.

Mohler JL, Gregory CW, Ford OH III et al.: The androgen axis in recurrent prostate cancer. Clin. Cancer Res. 2004. 10, 440-448

Montagnani Marelli M, Moretti RM, Dondi D, Motta M, Limonta P: Luteinizing hormone-releasing hormone agonists interfere with the mitogenic activity of the insulin-like growth factor system in androgen-independent prostate cancer cells, Endocrinology 1999; 140, 329-334

Montuori N, Carriero MV, Salzano S, Rossi G, Ragno P: The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions; The Journal of Biological Chemistry 2002; 277, 46932-46939

Montuori N, Visconte V, Rossi G, Ragno P: Soluble and cleaved forms of the urokinase-receptor: degradation products or active molecules? Thromb Haemostasis 2005; 93, 192-198

Moretti RM, Montagnani Marelli M, Dondi D et al.: Luteinizing hormone-releasing hormone agonists interfere with the stimulatory actions of epidermal growth factor in human prostate cancer cell lines, LNCaP and DU145, J Clin Endocrinol Metab 1996; 81, 3930-3937

Morimoto A, Tada K, Nakayama Y, Kohno K, Naito S, Ono M, Kuwano M: Cooperative roles of hepatocyte growth factor and plasminogen activator in tubular morphogenesis by human microvascular endothelial cells. Jpn. J. Cancer Res. 1994. 85, 53-62.

Muller YA, Christinger HW, Keyt BA, de Vos AM: The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: Multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure*. 1997. 5:1325-1338.

Mundy GR, Yoneda T: Mechanisms of bone metastasis. In: Orr FW, Singh GN, editors. *Bone metastasis: mechanisms and pathophysiology*. Austin Texas: R.G. Landes Co., 1996: 1-16

Murphy WA, Lance VA, Moreau S: Inhibition of rat prostate tumor growth by an octapeptide analog of somatostatin, *Life Sci*. 1987. 40 2515-2519

Mustjoki S, Sidenius N, Sier CF, et al.: Soluble urokinase receptor levels correlate with number of circulating tumor cells in acute myeloid leukemia and decrease rapidly during chemotherapy; *Cancer Res* 2000; 60, 7126-7132

Mutaguchi K. et al.: Restoration of insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 has a tumor-suppressive activity through induction of apoptosis in human prostate cancer. *Cancer Res*. 2003. 63,7717-7723

Myohanen HT, Stephens RW, Hedman K, Tapiovaara H, Ronne E, Hoyer-Hansen G, Dano K, Vaheri A: Distribution and lateral mobility of the urokinase-receptor complex at the cell surface; *J Histochem Cytochem* 1993; 41, 1291-1301

Naar AM, Lemon BD, Tjian R: Transcriptional activator complexes. *Ann. Rev. Biochem.* 2001; 70, 475-501

Nagase H, Woessner JF: Matrix metalloproteinases, *J Biol Chem* 1999; 274, 21491-21494

Nagy JA, Brown LF, Senger DR, Lanir N, Water L van de, Dvorak AM, et al.: Pathogenesis of tumor stromal generation: a critical role of leaky blood vessels and fibrin deposition; *Biochim Biophys Acta* 1989; 948, 305-326

Naimi B, Latil A, Fournier G, Mangin P, Cussenot O, Berthon P: Down-regulation of (IIIb) and (IIIc) isoforms of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) is associated with malignant progression in human prostate. *Prostate*. 2002. 52 245-252

Nakashiro K, Okamoto M, Hayashi Y, Oyasu R: Hepatocyte growth factor secreted by prostate-derived stromal cells stimulates growth of androgen-independent human prostatic carcinoma cells. *Am. J. Pathol.* 2000. 157, 795-803

Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsbouchi H, Blasi F, Comoglio PM: Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor, *EMBO J* 1992; 11, 4825-4833

Naslund MJ, Coffey DS: The differential effects of neonatal androgen, estrogen and progesterone on adult rat prostate growth, *J. Urol.* 1986. 136 (5) 1136-1140

Neill JD, Duck LW, Sellers JC, Musgrove LC: A gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) receptor specific for GnRH II in primates. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 282, 1012-1018

Nelson PS, Clegg N, Arnold H et al.: The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99, 11890-11895

Nesbit, RM, Plumb RT: Prostatic carcinoma, follow-up on 795 patients treated prior to the endocrine era and comparison of survival rates between these and patients treated by endocrine therapy. *Surgery.* 1946. 20: 263-272

Nevalainen MT, Valve EM, Makela SL, Blauer M, Tuohimaa PJ, Harkonen PL: Estrogen and prolactin regulation of rat dorsal and lateral prostate in organ culture, *Endocrinology.* 1991. 129 612-622.

Nevalainen MT, Harkonen PL, Valve EM, Wu P, Nurmi M, Martikainen PM: Hormone regulation of human prostate in organ culture, *Cancer Res.* 1993. 53 5199-5207

Nevalainen MT, Valve EM, Ingleton PM, Nurmi M, Martikainen PM, Harkonen PL: Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J. Clin. Invest.* 1997. 99 618-627

Nevalainen MT, Valve EM, Ingleton PM, Harkonen PL: Expression and hormone regulation of prolactin receptors in rat dorsal and lateral prostate. *Endocrinology.* 1996. 137 3078-3088.

Nickerson T, et al.: In vivo progression of LAPC-9 and LNCaP prostate cancer models to androgen independence is associated with increased expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I receptor (IGF-IR). *Cancer Res.* 2001. 61, 6276-6280

Nishimura K, Kitamura M, Takada S, Nonomura N, Tsujimura A, Matsumiya K, Miki T, Matsumoto K, Okuyama A: Regulation of invasive potential of human prostate cancer cell lines by hepatocyte growth factor. *Int. J. Urol.* 1998. 5, 276-281.

Ohno T, Imai A, Furui T, Takahashi K, Tamaya T: Presence of gonadotropin-releasing hormone and its messenger ribonucleic acid in human ovarian epithelial carcinoma, *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169, 605-610

Okajima A, Miyazawa K, Naitoh Y, Inoue K, Kitamura N: Induction of hepatocyte growth factor activator messenger RNA in the liver following tissue injury and acute inflammation. *Hepatology* 1997. 25, 97-102.

Oliver SE et al.: Serum insulin-like growth factor-I increase prostate cancer risk: a prospective study in a population-based nonscreened cohort. *J. Clin. Oncol.* 2004. 22, 3104-3112

Orio F., Jr, et al.: Potential action of IGF-1 and EGF on androgen receptor nuclear transfer and transactivation in normal and cancer human prostate celi lines. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002. 198, 105-114

Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M: Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *Journal of Biological Chemistry.* 1996. 271 15292-15297.

Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C: Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *PNAS.* 1998. 95 5672-5677

Ozasa K, Nakao M, Watanabe Y, Hayashi K, Miki T, Mikami K, Mori M, Sakauchi F, Washio M, Ito Y, Suzuki K, Wakai K, Tamakoshi A: Serum phytoestrogens and prostate cancer risk in a nested case-control study among Japanese men. *Cancer Sci.* 2004. 95 (1) 65-71.

Pappot H, Høyer-Hansen G, Ronne E, Hansen HH, Brunner N, Danø K, Grondahl-Hansen J. Elevated plasma levels of urokinase plasminogen activator receptor in non-small cell lung cancer patients, *Eur J Cancer*, 1997; 33 (6); 867-72.

Parr C, Jiang WG: Hepatocyte growth factor activators, inhibitors and antagonists and their implication in cancer intervention. *Histol. Histopathol.* 2001. 16, 251-268.

Pasdar M, Li Z, Marreli M, Nguyen BT, Park M, Wong K: Inhibition of junction assembly in cultured epithelial cells by hepatocyte growth factor/scatter factor is concomitant with increased stability and altered phosphorylation of the soluble junctional molecules. *Cell Growth Differ.* 1997. 8, 451-462.

Pasqualini R, Ruoslahti E: Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature.* 1996. 380:364-366

Patel YC, Greenwood MT, Panetta R: Mini review: the somatostatin receptor family, *Life Sci.* 2004. 57 1249-1265

Patterson BC, Sang QA: Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9), *J Biol Chem* 1997; 272, 28823-28825

Payson RA, Chotani MA, Chiu IM: Regulation of a promoter of the fibroblast growth factor 1 gene in prostate and breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 1998. 66 93-103.

Pedersen N, Schmitt M, Rønne E, Nicoletti MI, Høyer-Hansen G, Conese M, Giavazzi R, Danø K, Kuhn W, J.,nicke F, Blasi F: A ligand-free soluble urokinase receptor is present in the ascitic fluid from patients with ovarian cancer, *J Clin Invest* 1993; 92, 2160-216

Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K: Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem.* 1994. 269:6271-6274.

Petersen LC, Lund LR, Nielsen LS, Danø K, Skriver L: One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cell is a proenzyme with little or no intrinsic activity; *J Biol Chem* 1988; 263, 11189-11195

Pfluger H., Kirchheimer J.C., Hienert G., Binder B.R.: Urokinase: a specific marker of metastasation in prostate carcinoma, *J Urol* 1987; 137: 114A

Piironen T, Haese A, Huland H, Steuber T, Christensen IJ, Brunner N, Dano K, Hoyer-Hansen G, Lilja H. Enhanced discrimination of benign from malignant prostatic disease by selective measurements of cleaved forms of urokinase receptor in serum. *Clin Chem.* 2006. 52(5):838-44

Pollak M, Schally AV: Mechanisms of antineoplastic action of somatostatin analogs, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998. 217 143-146.

Pollak MN et al.: Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat. Rev. Cancer.* 2004. 4, 505-518

Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A: Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer.* 2000. 7 165-197

Pratt WB, Toft DO: Steroid receptor interaction with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 1997; 18, 306-360

Preissner KT: The role of vitronectin as multifunctional regulator in hemostatic and immune systems, *Blut* 1989; 59, 419-431

Prins GS: Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptors expression, *Endocrinology.* 1992. 130 3703-3714.

Prins GS, Woodham C, Lepinske M, Birch L: Effects of neonatal estrogen exposure on prostatic secretory genes and their correlation with androgen receptor expression in the separate prostate lobes of the adult rat. *Endocrinology.* 1993. 132 (6) 2387-2398

Prins GS, Birch L: Neonatal estrogen exposure up-regulates estrogen receptor expression in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology*. 1997. 138 (5) 1801-1809.

Prins GS, Birch L. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. *Endocrinology*. 1995. 136 (3) 1303-1314.

Prins GS, Marmer M, Woodham C, Chang W, Kuiper G, Gustafsson JA, Birch L: Estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. *Endocrinology*. 1998. 139 (3) 874-883

Pylkkanen L, Santti R, Newbold R, McLachlan LA: Regional differences in the prostate of the neonatally estrogenized mouse, *Prostate*. 1991. 18 (2) 117-129.

Pylkkanen L, Makela S, Valve E, Harkonen P, Toikkanen S, Santti R: Prostatic dysplasia associated with increased expression of c-myc in neonatally estrogenized mice. *J. Urol*. 1993. 149 (6): 1593-1601.

Qayum A, Gullick W, Mellon K et al.: The partial purification and characterisation of the GnRH-like activity from prostatic biopsy specimens and prostatic cancer cell lines, *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990; 37, 899-902

Quarmany VE, Beckman WCJ, Cooke DB, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS: Expression and localization of androgen receptor in the R-3327 Dunning rat prostatic adenocarcinoma, *Cancer Res* 1990; 50, 735-739

Rabbani SA, Harakidas P, Davidson DJ, Henkin J, Mazar AP: Prevention of cancer-prostate metastasis in vivo by a novel synthetic inhibitor of urokinase-type plasminogen activator (uPA), *Int J Cancer* 1995; 63: 840-845

Rabbani SA, Mazar AP, Bernier SM, Haq M, Bolivar I, Henkin J, et al.: Structural requirements for the growth factor activity of the amino-terminal domain of urokinase; *J Biol Chem* 1992; 267, 14151-14156

Ravenna L, Salvatori L, Morrone S, Lubrano C, Cardillo MR, Sciarra F, Frati L, Di Silverio F, Petrangeli E: Effects of triptorelin, a gonadotropin-releasing hormone agonist, on the human prostatic cell lines PC3 and LNCaP. *J Androl*. 2000. 21(4):549-57.

Reiter E, Hennuy B, Bruyninx M, Comet A, Klug M, McNamara M, Closset J, Hennen G: Effects of pituitary hormones on the prostate. *Prostate*. 1999. 38 159-165.

Renahan, AG et al.: Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systemic review and metaregression analysis. *Lancet*. 2004. 363, 1346-1353

Resnati M, Pallavicini I, Wang JM, et al.: The fibrinolytic receptor for urokinase activates the G protein-coupled chemotactic receptor FPRL1/LXA4R; *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99, 1359-1364

Resnati M, Guttinger M, Valcamonica S, Sidenius S, Blasi F, Fazioli F: Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the antagonist-induced chemotactic effect, *EMBO* 1996; 15: 1572-1582

Reubi JC, Schar JC, Waser B: Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SSTI-SSTS of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use, *Eur. J. Nucl. Med.* 2000. 27 273-282.

Reubi LC, Waser B, Schaer CJ: Somatostatin receptor SST1-SSTS expression in normal and neoplastic human tissue using receptor autoradiography with subtype-selective ligands, *Eur. J. Nucl. Med.* 2001. 28 836-846

Reubi LC, Waser B, Schaer JC: Somatostatin receptors in human prostate and prostate cancer, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995. 80 2806-2810.

Reubi JC: Neuropeptide receptors in health and disease: the molecular basis for in vivo imaging, *J. Nucl. Med.* 1995. 36 1825-1835

Riccio A, Grimaldi G, Verde P, Sebastio G, Boast S, Blasi F: The human urokinase-plasminogen activator gene and its promoter, *Nucleic Acid Res* 1985; 13 (8), 2759-2771

Riisbro R, Christensen IJ, Piironen T, Greenall M, Larsen B, Stephens RW, Han C, Hoyer-Hansen G, Smith K, Brunner N, Harris AL: Prognostic significance of soluble urokinase plasminogen activator receptor in serum and cytosol of tumor tissue from patients with primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002 8 1132-41

Risbridger G, Wang H, Frydenberg M, Cunha MR: The metaplastic effects of estrogen on prostate epithelium: proliferation of cells with basal cell phenotype. *Endocrinology.* 2001. 142 2443-2450.

Ropiquet F, Giri D, Kwabi-Addo B, Mansukhani A, Ittmann M: Increased expression of fibroblast growth factor 6 in human prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Cancer Research.* 2000b. 60: 4245-11250.

Rowan BG, Weigel NL, O'Malley BW: Phosphorylation of steroid receptor coactivator-L: Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry.* 2000. 275 4475-4483

Ruffion KA, Al-Sakkaf BL, Brown CL, Eaton FC, Hamdy PR, Dobson: The survival effect of prolactin on PC3 prostate cancer cells. *Eur. Urol.* 2003. 43 301-308.

Salo L, Makelà S, Stancel GM, Santti RS: Neonatal exposure to diethylstilbestrol permanently alter the basal and 17 beta-estradiol induced expression of c-fos proto-oncogene in mouse urethroprostatic complex, *Mol. Cell Endocrinol.* 1997. 126 133-141.

Scaccianoce E, Festuccia C, Dondi D, Guerini V, Bologna M, Motta M, Poletti A: Characterization of prostate cancer DU145 expressing the recombinant androgen receptor. *Oncology Research.* 2003; 14, 101-112

Schally AV, Comaru-Schally AM: Hypothalamic and other peptide hormones. In: Holland JF, Frei E III, Bast RC Jr, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, editors. *Cancer medicine*, 5th ed. Hamilton, Ontario: B.C. Decker; 2000; p 715-726.

Schally AV: Oncological applications of somatostatin analogs, *Cancer Res.* 1988. 48 6977-6985.

Schally AV, Nagy A: New approaches lo treatment of various cancers based on cytotoxic analogs of LHRH, somatostatin and bombesin, *Life Sci.* 2003. 72 2305-2320.

Schatz F, Krikun G, Runic R, Wang EY, Hausknecht V, Looockwood CJ: Implication of decidualization-associated protease expression implantation and placentation, *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17, 3-12

Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhjelmsen O, Magdolen V, Reuning U et al.: Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy, *Thromb Haemostasis* 1997; 78, 285-296

Sealfon SC, Weinstein H, Millar RP: Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor, *Endocr Rev* 1997; 18, 180-205

Segawa T, Nau ME, Xu LL et al.: Androgen-induced expression of endoplasmic reticulum (ER) stress response genes in prostate cancer cells. *Oncogene* 2002; 21, 8749-8758

Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1998. 219:983-985

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983. 219:983-985.

Shang Y, Myers M, Brown M: Formation of the androgen receptor transcription complex. *Moll. Cell.* 2002; 9, 601-610

Shapiro S.D.: Matrix metalloproteinases degradation of extracellular matrix. Biologocical consequences, *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 602-608

Shen R., Sumitomo M., Dai J., Harris A., Haminetz D. et al., Androgen-induced growth inhibition of androgen receptor expressing androgen-independent prostate cancer cells in mediated by increased levels of neutral endopeptidase. *Endocrinology*. 2000. 141, 1699-1704

Sherwood N, Lovejoy D, Coe I: Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones, *Endocr Rev* 1993; 14, 241-254

Sheta EA, Harding MA, Conaway MR, Theodorescu D: Focal adhesion kinase, Rap1, and transcriptional induction of vascular endothelial growth factor. *J Natl Cancer Inst*. 2000. 92:1065-1073.

Shung SY, Chung LW: Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanism and opportunities for therautic targeting. *Differentiation*. 2002; 70, 506-521

Shupnik MA: Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone, *Biol Reprod* 1996; 54, 279-286

Sidenius N, Blasi F: Domain 1 of the urokinase receptor (uPAR) is required for uPAR-mediated cell binding to vitronectin; *FEBS Lett* 2000; 470, 40-46

Sidenius N, Blasi F: The urokinase plasminogen activator system in cancer: Recent advances and implications for prognosis and therapy, *Cancer and Metastasis Reviews* 2003; 22, 205-222

Sidenius N, Sier CF, Blasi F. Shedding and cleavage of the urokinase receptor (uPAR): identification and characterisation of uPAR fragments in vitro and in vivo. *FEBS Lett*. 2000; 475(1): 52-56

Sier CFM, Stephens RW, Bizik J, Mariani A, Bassan M, Pedersen M, Frigerio L, Ferrari A, Danø K, Brunnel N, Blasi F: The level of urokinase-type plasminogen activator receptor is increased in serum of ovarian cancer patients, *Cancer Res* 1998; 58, 1843-1849

Silver RI, Wiley EL, Davies DL, Thigpen AE, Russel D,W, Mc-Connell JD, Espression and regulation of steroid 5a-reductase 2 in prostate desease. *J. Urol*. 1994; 152, 433-437

Smith JP, Solomon TE: Effects of gastrin, proglumide and somatostatin on growth of human colon cancer, *Gastroenterology*. 1988. 95 1541-1547

Soker S, Kaefer M, Johnson M, Klagsbrun M, Atala A, Freeman MR: Vascular endothelial growth factor-mediated autocrine stimulation of prostate

tumor cells coincides with progression to a malignant phenotype. *Am J Pathol.* 2001. 159:651-659

Stattin P, et al.: Plasma insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-binding proteins, and prostate cancer risk: a prospective study. *J. Natl Cancer Inst.* 2000. 92, 1910-1917

Stearns ME, Wang M: Type IV collagenase (Mr 72,000) expression in human prostate: benign and malignant tissue, *Cancer Res* 1993; 53, 878-883

Steiner MS, Barrack ER: Transforming growth factor- β 1 overproduction in prostate cancer: effects on growth in vivo and in vitro, *Mol Endocrinol* 1992; 6, 15-25

Stephens RW, Nielsen HJ, Christensen IJ, et al.: Plasma urokinase receptor levels in patients with colorectal cancer: relationship to prognosis; *J Natl Cancer Inst* 1999. 91, 869-874

Stephens RW, Pedersen AN, Nielsen HJ, Hamers MJ, Hoyer-Hansen G, Ronne E, Dybkjaer E, Dano K, Brunner N. ELISA determination of soluble urokinase receptor in blood from healthy donors and cancer patients. *Clin Chem.* 1997. 43(10): 1868-1876

Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA: Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis, *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9, 541-73

Still K, Robson CN, Autzen P, Robinson MC, Hamdy FC: Localisation and quantification of mRNA for matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2) in human benign and malignancy prostatic tissue, *Prostate* 2000; 42, 18-25

Stojilkovic SS, Catt KJ: Expression and signal transduction pathways of gonadotropin releasing hormone receptors, *Rec Prog Horm Res* 1995; 30, 161-205

Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ: Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways, *Endocr Rev* 1994; 15, 462-99

Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Micki GH, Paulson DF: Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU145); *Int J Cancer* 1978; 21, 274-281

Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arrestad A, Cioce V, Schiffmann E, et al.: Identification, purification and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein; *J Biol Chem* 1992; 267, 2524-2529

Sun YM, Flanagan CA, Illing N, Ott TR, Sellar R, Fromme BJ, Hapgood J, Sharp P, Sealfon SC, Millar RP: A chicken gonadotropin-releasing hormone receptor that confers agonist activity to mammalian antagonists. Identification of D-Lys(6) in

the ligand and extracellular loop two of the receptor as determinants. *J Biol Chem.* 2001. 16;276(11):7754-61

Tanaka A, Furuya A, Yamasaki M, Hanai N, Kuriki K, Kamiakito T, Kobayashi Y, Yoshida H, Koike M, Fukayama M: High frequency of fibroblast growth factor (FGF) 8 expression in clinical prostate cancers and breast tissues, immunohistochemically demonstrated by a newly established neutralizing monoclonal antibody against FGF 8. *Cancer Research.* 1998. 58 2053-2056

Tang DG, Dharam LL, Chopra P, Porter AT: Extended survivability of prostate cancer cells in the absence of trophic factors: increased proliferation, evasion of apoptosis, and the role of apoptosis proteins, *Cancer Res* 1998; 58, 3466-3479

Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN, Balk SP: Mutations of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer, *N Engl J Med* 1995; 332, 1393-8

Tensen C, Okuzawa K, Blomenhor M, Rebers F, Leurs R, Bogerd J, Schulz R, Goos H, *Eur J Biochem* 1997; 243, 134-140

The Veterans Administration Cooperative Urological Research Group. Carcinoma of the prostate: treatment comparisons. *J. Urol.* 1967. 98: 516-522

Tilley W.D., Buchanan G., Hickey T.E., Bentel J.M.: Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence, *Clin Cancer Res* 1996; 2: 277-285

Tilley WD, Wilson CM, Marcelli M, McPhaul MJ: Androgen receptor gene expression in human prostate carcinoma cell lines, *Cancer Res* 1990; 50, 5382-5386

Tisell LE: Tbc growth of the ventral prostate, the dorsolateral prostate, the coagulating glands and the seminal vesicles in castrated, adrenalectomized rats injected with oestradiol and/or cortisone, *Acta Endocrinol (Copenh.)*. 1971. 68 485-501

Tremblay G: Stromal aspects of breast carcinoma; *Exp Mol Pathol* 1979; 31, 248-260

Troski BE, Hapgood JP, Millar RP, Illing N: Complementary deoxyribonucleic acid cloning, gene expression and ligand selectivity of a novel gonadotrophin-releasing hormone receptor expressed in the pituitary and midbrain of *xenopus laevis*, *Endocrinology* 2000; 141, 1764-1771

Troskie B, Illing N, Rumbak E, SunYM, Hapgood J, Sealson SC, Millar RP, *Gen Comp Endocrinol* 1998; 112, 296-302

Udayakumar TS, Stratton MS, Nagle RB, Bowden GT: Fibroblast growth factor-1 induced promatrilysin expression through the activation of extracellular-regulated kinases and STAT3. *Neoplasia*. 2002. 4 60-67.

Unni E, Sun S, Nan B et al.: Changes in androgen receptor nongenotropic signalling correlate with transition of LNCaP cells to androgen independence. *Cancer Res*. 2004; 64, 7156-7168

Vagnarelli P, Raimondi E, Mazzieri R, De Carli L, Mignatti P: Assignment of the human urokinase receptor gene (PLAUR) to 19q13, *Cytogenet Cell Genet* 1992; 60, 197-199

Velasco AM, Gillis KA, Li Y et al.: Identification and validation of novel androgen-regulated genes in prostate cancer. *Endocrinology* 2004; 145, 3913-3924

Veldscholte J, Ris-Salpers C, Kuiper GGJM, Jenster G, Berrevoets C, Claasen E, van Rooij HCJ, Trapman J, Brinkman AO, Mulder E: A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens, *Biochem Biophys Res Comm* 1990; 173: 534-540

Waghray A, Feroze F, Schober MS et al.: Identification of androgen-regulated genes in the prostate cancer cell line LNCaP by serial analysis of gene expression and proteomic analysis. *Proteomics* 2001; 1, 1327-1338

Wahlberg K, Høyer-Hansen G, Casslen B: Soluble receptor for urokinase plasminogen activator in both full-length and a cleaved form is present in high concentration in cystic fluid from ovarian cancer; *Cancer Res* 1998; 58, 3294-3298

Wang L, Bogerd J, Choi HS, Soh JM, Chun SY, Blumenrohr M, McGregor A, Troskie BE, Millar RP, Kwon HB, *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98, 361-366

Wang J, Eltoum LE, Lamartiniere CA: Dietary genistein suppresses chemically induced prostate cancer in Lobund-Wistar rats. *Cancer Lett*. 2002. 186 (1) 11-18.

Warren RS, Yuan H, Math MR, Ferrara N, Donner DB: Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem*. 1996. 271:29483-29488

Wei Y, Lukashev M, Simon DI, Bodary SC, Rosenberg S, Doyle MV et al.: Regulation of integrin function by the urokinase receptor, *Science* 1996; 273, 1551-1555

Wei Y, Waltz DA, Rao N, Drummond RJ, Rosenberg S, Chapman HA: Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin, *J Biol Chem* 1994; 269, 32380-32388

Welch DR, Rinker-Schaeffer CW: What defines a useful marker of metastasis in human cancer? *J Natl Cancer Inst* 1999; 91, 1351-1353

Werb Z: ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology, *Cell* 1997; 91, 439-442

White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95, 305-309

Wilhelm O, Weidle U, Hohl S, Rettenberger P, Schmitt M, Graeff H: Recombinant soluble urokinase receptor as a scavenger for urokinase-type plasminogen activator (uPA). Inhibition of proliferation and invasion of human ovarian cancer cells. *FEBS Lett.* 1994; 337, 131-134.

Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA: General mechanism of metastasis; *Cancer* 1997; 80, 1529-1537

Woodson K, et al.: Serum insulin-like growth factor L tumor marker or etiologic factor? A prospective study of prostate cancer among Finnish men. *Cancer Res.* 2003. 63, 3991-3994

Xu LL, Su YP, Labiche R et al.: Quantitative expression profile of androgen-regulated genes in prostate cancer cells and identification of prostate-specific genes. *Int. J. Cancer* 2001; 92, 322-328

Xue W, Mizukami I, Todd RF, Petty HR: Urokinase-type plasminogen activator receptors associate with $\alpha 1$ and $\alpha 3$ integrins of fibrosarcoma cells: dependence on extracellular matrix components, *Cancer Res* 1997; 57, 1682-1689

Yano T, Pinski J, Radulovic S, Schally AV: Inhibition of human epithelial ovarian cancer cell growth in vitro by agonistic and antagonistic analogues of luteinizing hormone-releasing hormone, *PNAS* 1994; 91, 1701-1704

Yates C, Wells A, Turner T: Luteinising hormone-releasing hormone analogue reverses the cell adhesion profile of EGFR overexpression DU145 human prostate carcinoma subline. *Br J Cancer.* 2005. 92: 366-375

Ye Q, Chung LW, Cinar B, Li S, Zhau HE: Identification and characterization of estrogen receptor variants in prostate cancer cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2000. 75: 21-31

Yebra M, Parry GC, Stromblad S, Mackman N, Rosenberg S, Mueller BM, Cheresh DA. Requirement of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator for integrin $\alpha 5 \beta 1$ -directed cell migration *J Biol Chem.* 1996 271 29393-9.

Yin H, Cheng K, Hwa H, Peng C, Auersperg N, Leung P: Expression of the messenger RNA for gonadotropin-releasing hormone and its receptor in human cancer cell lines. *Life Sci* 1998; 62, 2015-2023

Yuan S, Trachtenberg J, Mills GB, Brown TJ, Xu F, Keating A: Androgen-induced inhibition of cell proliferation in an androgen-insensitive prostate cancer lines (PC3) transfected with a human androgen receptor complementary cDNA. *Cancer Res.* 1993; 53, 1304-1311

Zegarra-Moro O.L., Schimdt L.J., Huang H., Tindall D.J., Disruption of androgen receptor function inhibits proliferation of androgen-refractory prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62, 1008-1013

Zhang L, Johnson M. Le KH et al.: Interrogatin androgen receptor function in recurrent prostate cancer. *Cancer Res.* 2003; 63, 4552-4560

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questa esperienza desidero dedicare due righe alle persone che mi sono state vicine, e ringraziare per l'aiuto ricevuto:

la Prof.ssa Marcella Motta per avermi accolta in Istituto e dato fiducia in ogni occasione,

la Dott.ssa Donatella Dondi per la disponibilità e l'enorme pazienza mostratami, unite ai preziosi consigli che mi hanno aiutato a proseguire in questo mio tragitto,

Flavio per il suo continuo e costante sostegno anche nei momenti più difficili,

ed infine ringrazio mio fratello ed i miei genitori per avermi sempre sostenuta, incoraggiata e confortata, per i quali le parole di ringraziamento non saranno mai abbastanza.

GRAZIE